

Janne Rauta

# Kampylobakteerikontaminaatio maitotiloilla, *C.jejunin* biofilminmuodostus sekä MALDI- TOF-menetelmän validointi kampylobakteerien lajitunnistukseen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

03.03.2015

<p>Tekijä Otsikko</p> <p>Sivumäärä Aika</p>	<p>Janne Rauta Kampylobakteerien esiintyvyys maitotiloilla, <i>C.jejuni</i> biofilminmuodostus sekä MALDI-TOF-menetelmän validointi kampylobakteerien lajitunnistukseen</p> <p>46 sivua + 2 liitettä 03.03.2015</p>
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Laadunvalvonta ja tuotekehitys
Ohjaajat	<p>Jaostopäällikkö Marjaana Hakkinen Lehtori Carola Fortelius</p>
<p>Kampylobakteerit ovat yleisin ihmiselle suolistoinfektioita aiheuttava bakteeri maailmanlaajuisesti. Kampylobakteerit ovat yksi merkittävistä raakamaidon välityksellä leviävistä taudinaiheuttajabakteereista ja kampylobakteereiden aiheuttamia raakamaitoepidemioita on raportoitu Suomessa ja maailmalla useita. Kampylobakteereita esiintyy usein nautojen suolistomikrobifloorassa, mutta ne eivät aiheuta aikuisille eläimille sairautta.</p> <p>Työn tarkoituksena oli seurata kampylobakteerien esiintymistä naudoissa ja raakamaidossa kolmella eri raakamaitoa myyvällä maitotilalla, joiden nautakarjassa oli aikaisemmin todettu kampylobakteeria. Tutkittiin myös aiemmin raakamaidon välityksellä epidemian aiheuttaneen <i>Campylobacter jejuni</i> -kannan kykyä tuottaa biofilmiä lasi- ja teräspinnalle, sekä validoitiin MALDI-TOF-menetelmä korvaamaan kampylobakteerien lajitunnistuksessa käytetyt biokemialliset testit.</p> <p>Seurantajakson aikana (kolme kuukautta) kaikilta maitotiloilta eristettiin ulosteista kampylobakteereita. Maidosta tai suodattimista kampylobakteereita ei löydetty. Yhdestä ympäristönäytteestä eristettiin kampylobakteeria. Biofilmikokeissa saatiin alustavia tuloksia siitä, että tutkimallamme <i>C. jejuni</i> -kannalla on kyky tuottaa biofilmiä ainakin lasipinnalle mikroaerobisesti. MALDI-TOF-menetelmän validointi onnistui ja menetelmä hyväksyttiin akkreditoinnin piiriin.</p> <p>Tulosten perusteella näyttäisi siltä, että tutkittujen maitotilojen nautakarjan suoliston mikrobifloorassa on edelleen kampylobakteeria. Ulosteiden ja sitä kautta kampylobakteerien pääsy maitoon ja laitteistoon on kuitenkin pystytty estämään kaikilla maitotiloilla.</p>	
Avainsanat	raakamaito, kampylobakteeri, MALDI-TOF, biofilmi

Author Title	Janne Rauta Campylobacteria contamination in dairy farms, biofilm formation of <i>C. jejuni</i> and validation of MALDI-TOF application for identifying campylobacteria strains
Number of Pages Date	46 pages + 2 appendices 3 March 2015
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Bio- and food technology
Specialisation option	Quality control and research and development
Instructors	Marjaana Hakkinen, Division Manager Carola Fortelius, Principal Lecturer
<p><i>Campylobacter spp.</i> is the most common bacteria worldwide causing gastroenteric infections in humans. Campylobacteria are one of the significant pathogenic bacteria in raw milk and there have been several reports of raw milk outbreaks caused by campylobacteria in Finland and worldwide. Campylobacteria are often present in bovine intestinal tract, although it does not cause clinical disease in adult animals.</p> <p>The aim of the thesis was to monitor the occurrence of campylobacteria in cattle and raw milk on three different dairy farms. Each farm had been reported to have campylobacteria in their cattle in previous studies. It was also examined whether a <i>Campylobacter jejuni</i> strain, which had previously caused an outbreak via raw milk, had an ability to produce biofilm in glass and steel surfaces, and lastly the MALDI-TOF application was validated to replace biochemical tests used in identifying campylobacteria strains.</p> <p>During the monitoring period (three months) campylobacteria was isolated from all dairy farms from bovine fecal samples. Campylobacteria were not found in milk or filter samples. Campylobacteria was isolated from one environmental sample taken from a drinking trough. Results of biofilm tests suggest that <i>C. jejuni</i> has an ability to develop biofilm at least on a glass surface in microaerobic conditions. The validation of the MALDI-TOF method succeeded and the procedure was accepted to the domain of accreditation.</p> <p>Results suggest that every dairy farm still has campylobacteria in the bovine intestinal microflora. Campylobacter contamination of milk and milking equipments has, however, been successfully prevented on all three dairy farms.</p>	
Keywords	raw milk, campylobacteria, MALDI-TOF, biofilm

# Sisällys

## Lyhenteet

## Kirjallisuusosio

1	Johdanto	1
2	Raakamaito yleisesti	2
2.1	Raakamaidon määritelmä	2
2.2	Maidon käyttö ja tuotanto Suomessa	3
2.3	Meijeriin toimitettavan maidon laatu Suomessa	4
2.4	Raakamaidon käytön riskit	6
2.4.1	Maidon saastuminen	7
2.4.2	Tutkimuksia raakamaidon taudinaiheuttajista	9
2.4.3	Ruokamyrkytys ja elintarvikeinfektio	9
2.4.4	Ruokamyrkytysepidemiat	10
3	Kampylobakteerien tutkiminen	11
3.1	Kampylobakteerit yleisesti	11
3.1.1	Termofiiliset kampylobakteerit	13
3.1.2	<i>Campylobacter jejuni</i>	13
3.1.3	Muut kampylobakteerilajit	15
3.2	Mikroaerofiilisten kampylobakteerien kasvatust ja tunnistus	15
3.3	Biokemialliset testit	16
3.4	MALDI-TOF-MS -teknologia bakteerin tunnistamisessa	16
3.5	Bakteerien biofilminmuodostus	18
	Kokeellinen osio	21
4	Materiaalit ja menetelmät	21
4.1	Maitotiloilta tutkittavat näytteet	21
4.2	Näytteiden käsittely ja tutkiminen	22
4.3	MALDI TOF -laitteiston validointi	23
4.3.1	Validoinnin tarkoitus	23
4.3.2	Käytetyt bakteerikannat	25
4.4	Biofilmikokeet	26
4.4.1	Kokeiden tarkoitus	26

4.4.2	Kokeiden toteutus	27
5	Tulokset	29
5.1	Kampylobakteerien esiintyminen maitotiloilla	29
5.2	Validoinnin tulokset	30
5.2.1	Inkubointiaikojen vertailu	31
5.2.2	Tunnuslukuarvojen tarkastelu	32
5.2.3	Sensitiivisyys ja spesifisyys	33
5.3	Biofilmikokeiden tulokset	33
5.3.1	Biofilmikokeen toimivuuden testaus	34
5.3.2	Kahdeksan eri kannan vertailu	36
5.3.3	Aerobi- ja mikroaerobikasvun vertailu	36
5.3.4	Raakamaitoepidemiaan liittyneen kannan kyky muodostaa biofilmiä rosterilevyille	37
6	Tulosten tarkastelu	38
6.1	Maitotilojen näytteet	38
6.2	MALDI-TOF-menetelmän validointi	39
6.3	Biofilmikokeet	40
7	Yhteenveto	41
	Lähteet	43
	Liitteet	
	Liite 1. Biokemiallisen tunnistuksen ohje	
	Liite 2. Biofilmikokeiden laimennossarjojen tulokset	

## 1 Johdanto

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli seurata kampylobakteereiden esiintymistä kolmella lypsykarjatilalla, joiden nautakarjassa oli aiemmin todettu kampylobakteeria. Tutkittavia näytteitä olivat uloste, raakamaito, maitotankin suodatin, sivelynäyte juomastioista sekä yksi kaivovesinäyte. Lisäksi tutkittiin aiemmin raakamaidon välityksellä epidemian aiheuttaneen *Campylobacter jejuni* -kannan kykyä tuottaa biofilmiä lasi- ja teräspinnalle, sekä validoitiin MALDI-TOF-menetelmä korvaamaan kampylobakteerien lajitunnistuksessa käytetyt biokemialliset testit.

Opinnäytetyö toteutettiin Helsingin Viikissä sijaitsevalle Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran elintarvikemikrobiologiajaostolle vuoden 2014 keväällä. Opinnäytetyö oli osa isompaa, kolme vuotta kestävästä projektista, jonka aiheena oli ”Ihmiselle tautia aiheuttavien bakteerien esiintyminen ja kontaminaatiolähteet maitotiloilla ja raakamaidossa”. Projektissa tutkittiin kampylobakteerien lisäksi STEC- sekä *Listeria monocytogenes*-bakteereita

Raakamaidon on raportoitu aiheuttaneen useita ruokamyrkytys epidemioita Suomessa. Myös riskiryhmään kuuluvat henkilöt käyttävät raakamaitoa. (Perkiömäki ym. 2012: 32, 55). Tutkimuksia raakamaidon patogeeneista on kuitenkin tehty melko vähän, joten kyseinen tutkimus raakamaidosta oli paikallaan. Kuluttajien kiinnostus raakamaitoa kohtaan on myös kasvanut. Lähiruoan ja prosessoimattomien elintarvikkeiden arvostus, sekä julkisuudessa esitetyt väitteet ja kuluttajien omat uskomukset ovat lisänneet raakamaidon suosiota etenkin kaupunkialueilla. (Lindström ym. 2013: 2.)

Kampylobakteerien tutkimisessa ja toteamisessa käytettiin Eviran menetelmän mukaisia biokemiallisia testejä, jonka lisäksi eristetyt, kampylobakteereiksi biokemiallisesti tunnistetut kannat ajettiin MALDI-TOF-laitteistolla validointia varten. Biofilmikokeet aloitettiin työssäoloni aikana ja niitä ehdittiin tehdä neljä kappaletta.

## 2 Raakamaito yleisesti

### 2.1 Raakamaidon määritelmä

Euroopan parlamentin ja Euroopan neuvoston asetuksen (EY/853/2004) mukaan raakamaito on maitoa, jota ei ole kuumennettu yli 40 °C:seen tai käsitelty millään muulla vastaavalla tavalla. Raakamaitoon ei ole lisätty eikä siitä ole poistettu mitään. Raakamaitoa saa käsitellä tilalla ainoastaan jäähdyttämällä ja annostelemalla se kuluttajan astiaan. Säilöittäessä ja kuljetettaessa raakamaitoa sen lämpötila saa nousta korkeintaan 6 °C:seen. Maidontuotannon hygieniää ja tuotantotapoja ohjataan sekä kansallisesti että EU-tasolla. (Perkiömäki ym. 2012: 15 - 16.)

Myytävän raakamaidon on täytettävä niin sanotun E-luokan solu- ja bakteerivaatimukset. Lehmän ja vuohen raakamaidon kokonaismikrobimäärä saa olla korkeintaan 50 000 pmy/ml (30 °C:ssa) ja lehmän raakamaidossa somaattisten solujen lukumäärä saa olla enintään 250 000 pmy/ml. *L. monocytogenes*-, *Salmonella*- ja *STEC* -bakteereita sekä lämpökestoisia kampylobakteereita ei saa esiintyä ollenkaan (25 ml:ssa), mikäli raakamaitoa myydään vuodessa yli 2 500 kg. Alle 2 500 kg raakamaitoa vuodessa myyvien tilojen ei kyseisiä bakteereita tarvitse erikseen tutkituttaa maidosta. (MMM. 2013: 8.)

Maidontuottaja saa luovuttaa ilman erillistä ilmoitusta elintarvikehuoneistosta enintään 2 500 kg ternimaitoa tai 2 500 kg muuta raakamaitoa vuodessa. Jäädyltettyä ternimaitoa saa toimittaa vähittäismyyntiin korkeintaan 2 500 kg vuodessa. (Perkiömäki ym. 2012: 17; MMM. 2013.)

Vuodesta 2014 lähtien raakamaidon myyjän on täytynyt antaa ostajalle kirjallisesti tietoa maidon säilytysajasta ja -lämpötilasta sekä tieto siitä, että raakamaitoa saa antaa riskiryhmään kuuluville ainoastaan lämpökäsiteltynä (MMM. 2013).

Tinkimaidolla (tunnetaan myös nimellä tilamaito) tarkoitetaan raakamaitoa, joka myydään maitotilalta suoraan kuluttajan astiaan. Ternimaito on raakamaitoa, jota lypsetään 3 - 5 päivän ajan poikimisen jälkeen. Ternimaidon saa jäädylttää maitotilalla, jonka jälkeen se on säilytettävä -12 °C:ssa tai kylmemmässä. (Perkiömäki ym. 2012: 12, 15.)

## 2.2 Maidon käyttö ja tuotanto Suomessa

Kuluttajien lisääntyvä arvostus luomu- ja lähituotantoa kohtaan sekä raakamaidon luonnollisuus ja sen maku ovat lisänneet raakamaidon kysyntää viime vuosina. Raakamaidon käyttäjät haluavat myös välttää keinotekoisia lisä- ja säilöntäaineita, joita ei tosin ole pastöroidussa ja käsitellyssä maidossakaan. (Pietilä 2011.)

Elintarviketurvallisuusvirasto teetti vuonna 2011 kyselyn koskien raakamaidon käyttöä. Kyselyyn vastanneista noin puolet valitsi raakamaidon sen terveellisyyden perusteella. Käyttäjät uskoivat, että raakamaidon ravintosisältö on parempi kuin käsitellyn maidon. Raakamaidon käyttäjät totesivat myös, että raakamaito vaikuttaa ehkäisevästi allergioiden ja iho-ongelmien syntyyn. Osa laktoosi-intoleranteista kertoi voivansa nauttia raakamaitoa ilman vatsaoireita. (Pietilä 2011.)

Väitteitä luomutuotetun maidon terveellisyydestä tukee ainakin Elgersman ym. (2006: 1) tekemä tutkimus. Tutkimuksen mukaan lehmät, jotka saivat ravintonsa laiduntamalla, tuottivat enemmän konjugoituja linolihappoja sekä välttämättömiä rasvahappoja kuin ne lehmät, jotka söivät maissirehua. Toisen, Saidin ym. (1989) tutkimuksen mukaan maidosta saatava A-vitamiinin imeytymistä edesauttava proteiini, beta-laktoglobuliini, tuhoutuu pastöroinnin vaikutuksesta. On siis mahdollista, että raakamaito olisi ainakin joltain osin terveellisempää kuin kuumennuskäsitelty maito.

Suomessa maidontuotanto on kasvinviljelyn jälkeen toiseksi yleisin päätuotantosuunta (Perkiömäki ym. 2012: 26). Kiintiökaudella 2012/2013 maitoa tuottavia tiloja oli 9 052, jotka tuottivat maitoa yhteensä noin 2 180 miljoonaa litraa (Taulukko 1), josta luomumaitoa oli 41 214 litraa. Vuonna 2013 maidontuotannosta luopui 540 tilaa. Luomumaitotiloja oli 132 vuonna 2013. Viimeisen kymmenen vuoden aikana maitomäärä tilaa kohti on lähes kaksinkertaistunut. Keskimääräinen tilalta meijeriin toimitettava maitomäärä on 223 000 litraa. (Tike 2014.)



Taulukko 1. Maidontuottajien ja tuotetun maidon määrä 2000-luvulla. (Tike 2014)

Vuosi	Maidontuottajia (kpl)	Tuotettu maitomäärä (1000 l)
2013	9 052	2 220 198
2012	9 592	2 188 383
2011	10 239	2 189 619
2010	10 923	2 221 907
2009	11 516	2 214 809
2008	12 267	2 188 273
2007	13 271	2 226 233
2006	14 564	2 279 226
2005	15 844	2 293 005
2004	16 928	2 303 536
2003	18 143	2 323 324
2002	19 416	2 376 195
2001	20 731	2 378 002
2000	22 225	2 370 981

Suomessa juotiin maitoa vuonna 2012 keskimäärin noin 130 litraa henkilöä kohden vuodessa. Tästä noin puolet oli kevytmaitoa, 40 prosenttia rasvatonta ja 10 prosenttia täysmaitoa. Raakamaidon osuus kaikesta kulutetusta maidosta oli noin yksi prosenti. (Tike 2014.)

### 2.3 Meijeriin toimitettavan maidon laatu Suomessa

Meijeriin myytävä raakamaito on Suomessa luokiteltu sen sisältämän kokonaisbakteerimäärän mukaan erilaisiin luokkiin. E-luokkaan kuuluvassa maidossa saa bakteerien määrä olla korkeintaan 50 000 pmy/ml (kahden kuukauden geometrinen keskiarvo) ja somaattisten solujen määrä korkeintaan 250 000 solua/ml (kolmen kuukauden geometrinen keskiarvo) (Taulukko 2). Nykyään maidon luokittelu ja hinta määräytyy täysin meijereiden harkinnan mukaan. Hinnoittelussa esiintyy vaihtelua meijereiden välillä, mutta luokituskäytäntö on yhtenäinen. (Maitohygienialiitto 2012.)

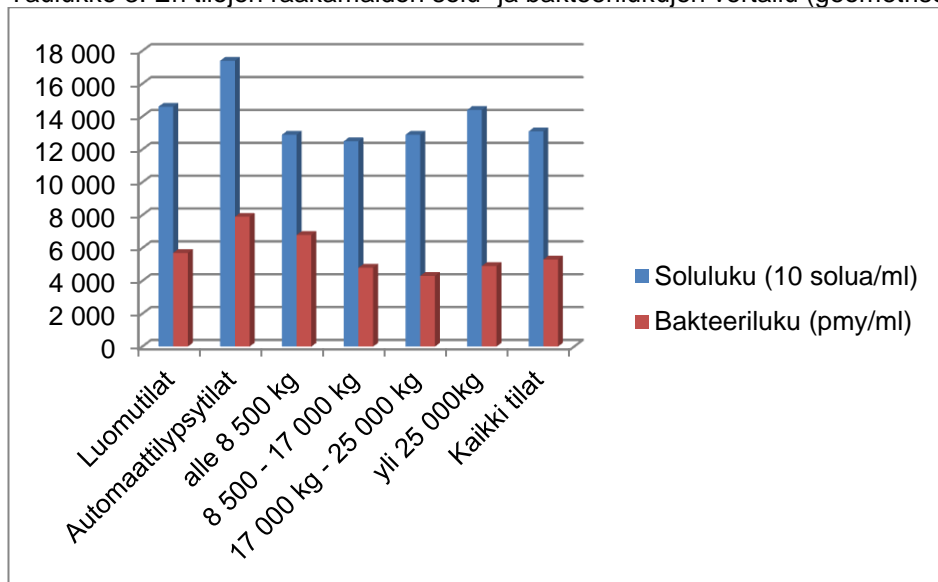
Taulukko 2. Maidon laatuhinnoittelussa meijerien käyttämä luokitus.

Luokka	Bakteerien määrä pmy/ml	Somaattisten solujen määrä/ml
E	< 50 000	< 250 000
I	50 000 - 100 000	250 000 - 400 000
II	> 100 000	> 400 000

Suomessa myytävä maito on korkealaatuista. Vuonna 2012 E-luokkaan kuului 95,1 % myydystä maidosta. E-luokan lisäksi käytössä on I ja II-luokat. Vuonna 2012 I-luokkaan kuului 4,9 % myytävästä maidosta, joten II-luokan maitoa ei käytännössä tuotettu. (Maitohygienialiitto 2014.)

Suomessa myydyin maidon bakteerilukujen geometrinen keskiarvo vuonna 2011 oli 5 300 pmy/ml. Suomessa tuotetun raakamaidon somaattisten solulukujen geometrinen keskiarvo vuonna 2012 oli 131 000 solua/ml. Soluluku kuvaa lehmään utareen terveyttä. Terveellä lehmällä solupitoisuus on alle 100 000 solua/ml, mutta utaretulehdus voi nostaa selkeästi solulukua. Taulukossa 3 on vertailtu eri maitotilojen raakamaidon solu- ja bakteerilukuja Suomessa vuonna 2012. Automaattilypsy- ja luomutilojen lisäksi taulukossa on otettu huomioon erikokoiset tilat. Kilogrammamäärät kuvaavat tilan tuottaman maidon määrää/kk. (Maitohygienialiitto 2014.)

Taulukko 3. Eri tilojen raakamaidon solu- ja bakteerilukujen vertailu (geometriset keskiarvot).



Suomessa tuotetun maidon laatua seurataan säännöllisesti säädösten mukaisesti (Taulukko 3.). Monet meijerit kuitenkin testaavat maitoa useammin kuin mitä säädökset

vaativat. Testien lisäksi alkutuottajan on toimitettava maidon vastaanottajalle (mikäli se on elintarvikehuoneisto) tiedot elintarviketurvallisuuteen vaikuttavista karjassa esiintyvistä sairauksista, muista vastaavista haitoista sekä vierasainelöydöksistä vuoden ajalta. (Perkiömäki ym. 2012: 16.)

Taulukko 3. Raakamaidosta tehtävät testit ja niiden raja-arvot. (Perkiömäki ym. 2012: 16. Muokattu)

Testattava suure	Seurantatiheys	Raja-arvo
<b>1. Raakamaitoa tuottava nautatila</b>		
aistinvarainen laatu	säännöllisesti	ei poikkeavaa hajua eikä ulkonäköä
mikrobilääkejäämät	säännöllisesti	ei jäämiä
kokonaismikrobimäärä (30 °C)	2 näytettä / kk	alle 50 000 pmy/ml
solujen määrä (soluluku)	1 näyte / kk	alle 250 000 solua/ml
jäätymispiste	säännöllisesti	-0,520 °C
<b>2. Maitoalan laitos</b>		
aistinvarainen arviointi <sup>1</sup>	jokainen erä	ei poikkeavaa hajua eikä ulkonäköä
mikrobilääkejäämät <sup>1</sup>	jokainen erä	korkeintaan sallittu enimmäispitoisuus
kokonaismikrobimäärä (30 °C) <sup>2</sup>	jokainen erä	alle 300 000 pmy/ml
kokonaismikrobimäärä (30 °C) <sup>3</sup>	jokainen erä	alle 100 000 pmy/ml

<sup>1</sup> Laitokseen kuljetettu raakamaito

<sup>2</sup> Tuotteiden valmistukseen tarkoitettu raakamaito

<sup>3</sup> Tuotteiden valmistukseen tarkoitettu lämpökäsitelty maito

Maidosta tutkittavia mikrobilääkejäämiä todetaan harvoin Suomessa, sillä lääkkeiden käyttö on tiukasti kontrolloitua. Vuonna 2011 tutkiittiin 18 096 näytettä, joista antibioottijäämiä löydettiin 0,16 %:sta. Maito testataan mikrobilääkejäämien varalta maitotilalla jo ennen kuin maito siirretään meijeriautoon. Maito testataan uudelleen meijerillä, ja mikäli mikrobilääkejäämiä löytyy, niin koko maitoerä hylätään. (Maitohygienialiitto 2014.)

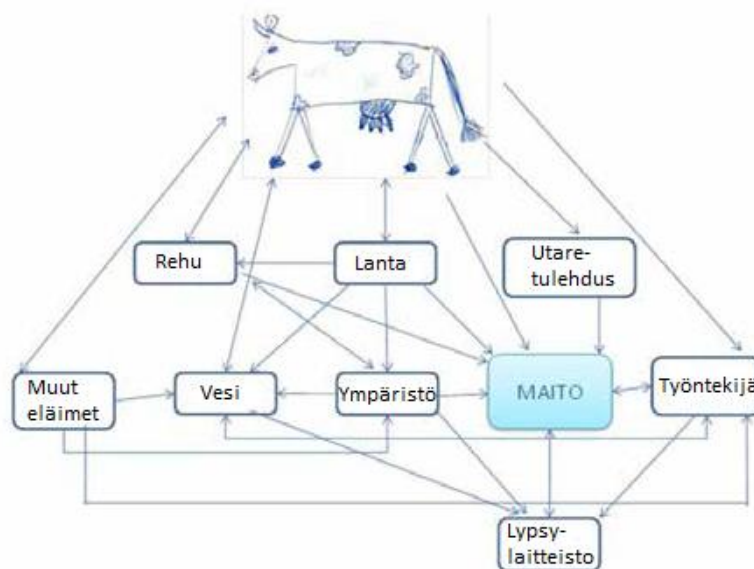
## 2.4 Raakamaidon käytön riskit

Suomalainen maito ja siitä valmistetut maitotuotteet ovat hyvälaatuisia ja niiden käyttö aiheuttaa harvoin vaaraa terveydelle. Lämpökäsittely ja korkealaatuiset raaka-aineet parantavat maidon mikrobiologista laatua merkittävästi ja tuhoavat maidossa mahdollisesti olevat patogeenit. Raakamaidon käyttöä sen sijaan tulisi aina miettiä, sillä

raakamaitoa ei ole lämpökäsitelty, jolloin siinä saattaa esiintyä patogeenisia mikrobeja. Etenkin riskiryhmään kuuluville (lapset, vanhukset, raskaana olevat tai henkilöt, joilla on vastustuskykyä heikentävä perussairaus) henkilöille raakamaito voi aiheuttaa vakavankin ruokamyrkytyksen.

#### 2.4.1 Maidon saastuminen

Maito itsessään on periaatteessa steriiliä (mikäli lehmä on terve), joten saastuminen tapahtuu vasta, kun maito lypsetään. Usein maidon saastuminen tapahtuukin juuri lypsyn yhteydessä. Maito voi saastua maitotilalla joko suoraan eläimestä (esim. utaretulehdus) tai epäsuorasti. Merkittävimpiä saastutuksen lähteitä ovat rehu, lanta, naudan utaretulehdus, muut eläimet, vesi, ympäristö, työntekijä ja lypsylaitteisto (Kuva 1). (Perkiömäki ym. 2012: 37.)



Kuva 1. Maidon saastumiseen vaikuttavia tekijöitä maitotilalla. (Perkiömäki ym. 2012: 37. Muokattu)

Lanta on yksi merkittävimmistä saastumisen lähteistä, sillä se voi saastuttaa maitoa joko suoraan tai epäsuorasti, saastuttamalla ympäristöä, vettä, rehua tai utareita. Lannan joutuminen utareisiin voi aiheuttaa maidon saastumisen lypsyn yhteydessä. Lisäksi eläinten ja ympäristön puhtaanapidon laiminlyönti, sekä eläinten suuri määrä tilalla voivat lisätä lannasta johtuvaa saastumista. (Perkiömäki ym. 2012: 38.)

Navettaympäristöllä on myös merkittävä rooli maidon saastuttajana. Rakenteiden sijoittelu, kunto ja puhdistettavuus sekä ilmanvaihto vaikuttavat maidon laatuun ja mahdolliseen saastumiseen. Parsien ja lattiarakenteiden puhtaus voi vaikuttaa utareiden puhtauteen ja sitä kautta myös maidon laatuun. Lisäksi myös lannanpoistotapa ja jätteiden käsittely vaikuttavat osaltaan maidon laatuun. (Perkiömäki ym. 2012: 38.)

Lypsylaitteiston puhtaudella sekä hyvällä lypsyhygienialla voidaan vaikuttaa merkittävästi maidon laatuun. Lypsylaitteiston puhdistuksessa erityisen tärkeää on mekaaninen puhdistus, sillä pesuaineet eivät useinkaan tehoa kohteisiin, joita ei ole esipuhdistettu. Tietyt bakteerit voivat muodostaa biofilmiä esimerkiksi lypsylaitteistojen saumakohtiin, jolloin edes mekaaninen puhdistus ja pesuaineiden käyttö yhdessä eivät välttämättä tuhoa haitallisia mikrobeja. Automaattilypsämisen laitteisto- ja utarepesuongelmien, sekä usein myös lypsykoneiden huonon kunnon seurauksena maidon mikrobiologinen laatu on heikompaa automaattilypsämisessä kuin käsilypsämisessä. (Perkiömäki ym. 2012: 38 - 39.)

Rehun huono mikrobiologinen laatu vaikuttaa myös maidon laatuun. Rehun mikrobit ovat usein itiöllisiä bakteereja, jolloin ne säilyvät hyvin naudan suolistossa ja voivat sitä kautta päätyä lannan välityksellä maitoon. Rehut voivat lisäksi levittää itiöllisiä bakteereita ilman välityksellä utareiden pintaan ja sitä kautta maitoon. (Perkiömäki ym. 2012: 39.)

Eläinten juomavetenä sekä utareiden ja lypsylaitteiston puhdistuksessa käytetty vesi, työntekijöiden ja muiden navetassa vierailevien ihmisten hygieenisuus sekä muiden eläinten (tilan muut tuotantoeläimet, haittaeläimet ja lemmikit) läsnäolo vaikuttavat osaltaan maidon laatuun. Myös lehmän terveydentilalla on suuri merkitys maidon puhtauteen. Esimerkiksi utaretulehdusta sairastava lehmä voi saastuttaa maidon lypsyn yhteydessä. (Perkiömäki ym. 2012: 39 - 40.)

Tämän työn kannalta merkittävin bakteeri, *C. jejuni*, päätyy raakamaitoon todennäköisesti lannan, muiden eläinten, veden, ympäristön tai työntekijöiden välityksellä. Muita merkittäviä maidossa esiintyviä taudinaiheuttajabakteereja ovat muun muassa *Bacillus cereus*, *EHEC*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Streptococcus equi* sekä *Yersinia enterocolitica* ja *Y. pseudotuberculosis*. (Perkiömäki ym. 2012: 37.)

Maitotilalta lähtiessään raakamaito voi saastua kuljetuksen tai varastoinnin aikana. Likaiset kuljetus/säilytysastiat voivat saastuttaa maidon, jonka lisäksi liian korkeat kuljetus- tai säilytyslämpötilat voivat edesauttaa joidenkin patogeenisten bakteerien kasvua.

#### 2.4.2 Tutkimuksia raakamaidon taudinaiheuttajista

Suomessa tutkimuksia raakamaidossa esiintyvistä patogeeneista on tehty melko vähän. Vuonna 2008 Meriluodon (2009: 20, 60 - 61) tekemässä tutkimuksessa 281 tutkitusta raakamaitonäytteestä 2,8 % todettiin positiiviseksi *L.monocytogenes*-bakteerin suhteen. Tutkimuksessa todettiin myös, että suurimpana raakamaidon mikrobiologista laatua heikentävänä tekijänä voidaan pitää aerobisia bakteeri-itiöitä. Lisäksi anaerobisten klostridi-itiöiden määrän todettiin yli kolminkertaistuneen viimeisen kymmenen vuoden aikana. Tästä huolimatta tutkimuksessa todettiin, että meijeriin toimitettavan raakamaidon mikrobiologinen laatu Suomessa on erittäin hyvä.

Helsingin yliopiston eläinlääketieteellisen tiedekunnan vuonna 2011 teettämässä tutkimuksessa 6 % tutkituista raakamaitonäytteistä sisälsi *L.monocytogenes*-bakteereita. Shigatoksisia *Escherichia coli* (STEC) -bakteereita todettiin 3 % näytteistä. Kampylobakteereja ja salmonellaa ei tutkituista näytteistä löytynyt. Kokonaisbakteerimäärä 183 tilalta tutkitusta näytteestä oli noin 13 000 pmy/ml. Tutkimuksen perusteella todettiin, että Suomessa tuotettu maito on laadultaan vaihtelevaa, mutta pääosin hyvälaatuaista, vaikka maito sisältää varsin yleisesti uloste- ja ihoperäisiä mikrobeja. Raakamaidon todettiin olevan potentiaalinen tartunnanlähde, etenkin riskiryhmään kuuluville henkilöille. (Perkiömäki ym. 2012: 31.)

#### 2.4.3 Ruokamyrkytys ja elintarvikeinfektio

Ruokamyrkytyksestä puhuttaessa voi kyseessä olla joko ruokamyrkytys tai elintarvikeinfektio. Maidon tai maitotuotteiden aiheuttamissa ruokamyrkytystapauksissa on usein kyse elintarvikeinfektiosta.

Ruokamyrkytys johtuu bakteereista, jotka kasvaessaan tuottavat toksinia ympäristöönsä. Bakteeritoksiinit kertyvät elintarvikkeeseen, mikäli bakteerien kasvuvaihe tapahtuu elintarvikkeessa. Tällöin henkilö sairastuu melko nopeasti

syömisen jälkeen. Jotkin bakteeritoksiinit kestävät jopa sterilointilämpötiloja, osa taas tuhoutuu kuumennettaessa. Ruokamyrkytyksen voi siis saada, vaikka toksiineja tuottavat bakteerit olisivatkin tuhottu elintarvikkeesta. Tyypillisiä bakteeritoksiineja tuottavia bakteereja ovat *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* ja *Staphylococcus aureus*. (Hallanvuori & Johansson 2010: 12.) Ruokamyrkytyksen tehokkain ehkäisykeino on ruoan nopea jäädyttäminen +4 °C:seen, jolloin toksiineja tuottavat bakteerit eivät pääse lisääntymään (Lehtinen 2012).

Elintarvikeinfektio kehittyy, kun patogeeni bakteeri pääsee ruoan tai juoman mukana ihmisen suolistoon ja alkaa lisääntymään siellä. Infektioon vaadittava bakteerimäärä elintarvikkeessa voi olla hyvinkin pieni. Päästyään elimistöön, bakteeri alkaa lisääntymään suolistossa nopeasti, aiheuttaen infektion, joka saattaa levitä muualle potilaan elimistöön. Elintarvikeinfektio voi huonon käsihygienian seurauksena tarttua ihmisestä toiseen, toisin kuin ruokamyrkytys. Merkittävimmät eläimistä ihmisiin elintarvikkeiden välityksellä tarttuvat elintarvikeinfektioita aiheuttavat bakteerit Suomessa ovat salmonella, kampylobakteerit, *EHEC*-bakteerit, *Listeria monocytogenes*, *Y. enterocolitica* ja *Y. pseudotuberculosis*. Kampylobakteerien ja norovirusten on raportoitu aiheuttaneen erityisesti vesivälitteisiä infektioita. (Hallanvuori & Johansson 2010: 12.) Tehokkain keino ehkäistä elintarvikeinfektion synty on kuumentaa ruoka (> 70 °C), jolloin patogeenit bakteerit kuolevat (Lehtinen 2012).

#### 2.4.4 Ruokamyrkytysepidemiat

Elintarviketurvallisuusvirasto määrittelee ruokamyrkytysepidemian seuraavasti:

Ruokamyrkytysepidemialla tarkoitetaan tapausta, jossa vähintään kaksi henkilöä on saanut samanlaatuisen sairauden syötyään samaa ruokaa tai juotuaan samaa vettä ja jossa kyseinen ruoka tai vesi on sairauden aiheuttaja. Alueellisessa epidemiassa saastunut elintarvike aiheuttaa sairastumisia samalla maantieteellisellä alueella (esim. kunta) tai eri paikkakunnilla. Jos kaikki sairastuneet kuuluvat samaan ruokatalouteen, kutsutaan ruokamyrkytystä perhe-epidemiaksi. (Evira 2013.)

Ruokamyrkytysepidemioissa on otettu huomioon yhtenä kokonaisuutena ruokamyrkytykset ja elintarvikeinfektiot.

Pastöroitu maito ja maitotuotteet aiheuttavat hyvin harvoin ruokamyrkytysepidemioita Suomessa ja Euroopassa. Ruokamyrkytysepidemiat ovat useimmiten muiden

elintarvikeryhmien kuin maitotuotteiden aiheuttamia. Yleisimmät ruokamyrkytys epidemioita aiheuttavat elintarvikkeet ovat liha ja lihavalmisteen, tuoreet kasvikset ja niistä valmistetut tuotteet sekä kala ja kalavalmisteen. Raakamaidon aiheuttamien ruokamyrkytysten määrä on suhteessa suurempi verrattuna lämpökäsiteltyihin maitotuotteisiin. (Perkiömäki ym. 2012: 32)

Vuosittain raportoiduista epidemioista yleensä yli 90 % on elintarvikevälikkeisiä ja loput talousvesivälikkeisiä. Eniten sairastuneita on kuitenkin ollut vesivälikkeisissä epidemioissa (esim. Nokian vesiepidemia vuonna 2007). Raportoiduista ruokamyrkytys epidemioista noin kolmasosassa tartunnan aiheuttanutta elintarviketta ei pystytty toteamaan tai tartunnan lähteeksi epäillään useampaa kuin yhtä elintarviketta. (Zoonosikeskus 2014b)

Vuosina 1999 - 2014 Suomessa on raportoitu 12 lehmän tai vuohen raakamaidosta tai raakamaitotuotteesta aiheutunutta ruokamyrkytys epidemiaa (THL 2013; Zoonosikeskus 2014b; THL 2014). *C.jejuni* on ollut taudinaiheuttajana ainakin kolmessa epidemiassa (vuonna 2012 kaksi epidemiaa ja vuonna 2007 yksi epidemia) (Zoonosikeskus 2014b). On kuitenkin arvioitu, että raportoidut ruokamyrkytystapaukset kattavat vain pienen osan todellisista ruokamyrkytyksistä (Jaakkonen ym. 2013: 1).

### 3 Kampylobakteerien tutkiminen

#### 3.1 Kampylobakteerit yleisesti

Kampylobakteerit ovat joko anaerobisia tai mikroaerofiilisiä gramnegatiivisia sauvoja, joilla on spiraalimainen tai kaartuva S-mainen muoto (Gunther & Chen 2008: 1). Useimmat kampylobakteerikannat kuolevat muutamassa tunnissa aerobisissa olosuhteissa, mutta on olemassa kantoja, jotka sopeutuvat siten, että ne pystyvät kasvamaan aerobisissa olosuhteissa (Chynoweth ym. 1998: 1). Mikroaerofiiliset kannat kasvavat parhaiten, kun ilman happipitoisuus on 5 - 6 %. Niiden optimikasvulämpötila on 35 - 37 °C, mutta ne voivat kasvaa 25 - 43 °C:ssa. (Doyle 1989: 74.) Kampylobakteerit ovat herkkiä korkeille lämpötiloille, joten ne kuolevat esimerkiksi maitoon normaalisti tehtävässä pastörintikäsitelyssä.



Kampylobakteerit ovat poikkeuksellisia, kun niitä vertaa muihin ruokaperäisiin patogeeneihin (esimerkiksi *Salmonella typhimurium* ja *Listeria monocytogenes*). Ne eivät kestä ilman normaalia happipitoisuutta, mutta tarvitsevat 3 - 15 % happipitoisuuden lisääntyäkseen. (Perkiömäki ym. 2012: 83.) Kampylobakteerit ovat myös hyvin herkkiä muille ympäristön vaikutuksille, kuten kuivuudelle, korkealle suolapitoisuudelle, alhaiselle pH:lle (alle 4,9) ja korkealle lämpötilalle (Park 2002: 2 - 3).

Kampylobakteerit elävät monien tasalämpöisten eläinten, muun muassa kanojen, karjan ja lintujen, suoliston normaalifloorassa. Linnut voivat toimia kampylobakteerien tartuttajina muille eläimille kontaminoimalla niiden käyttöveden. (Lawley 2013; Reeser ym. 2007: 1.) Lisäksi karpäset voivat levittää tartuntaa esimerkiksi ympäristöstä broilerihalleihin (Perkiömäki ym. 2012: 83).

Maailmalla suurin osa kampylobakteeri-infektioista aiheutuu siipikarjanlihan käytöstä ja käsittelystä (Ban 2001: 1). Suomessa kampylobakteeri-infektioiden esiintyvyys on korkeampi kuin useammissa muissa Euroopan maissa, vaikkakin siipikarjasta saatujen kampylobakteeri-infektioiden esiintyvyys on Suomessa Euroopan alhaisimpia (Hakkinen 2010: 1). Yksi selittävä tekijä korkeisiin kampylobakteeri-infektioihin Suomessa verrattuna muihin Euroopan maihin voi olla eri maiden erilaiset raportointikäytännöt.

Vuositasolla Suomessa todetuista tartunnoista suurin osa on ulkomailta peräisin, mutta kesäisin on havaittavissa selvä piikki kotimaasta saaduissa tartunnoissa (Hakkinen 2010: 1). Arvion mukaan noin kolmasosa kesäaikana saaduista kotimaisista tartunnoista liittyy broilereihin ja joka viides nautoihin. Noin puolet kotimaisista kampylobakteeritartunnoista saadaan kuitenkin muista lähteistä, kuten esimerkiksi saastuneesta juomavedestä. (Zoonosikeskus 2014a.)

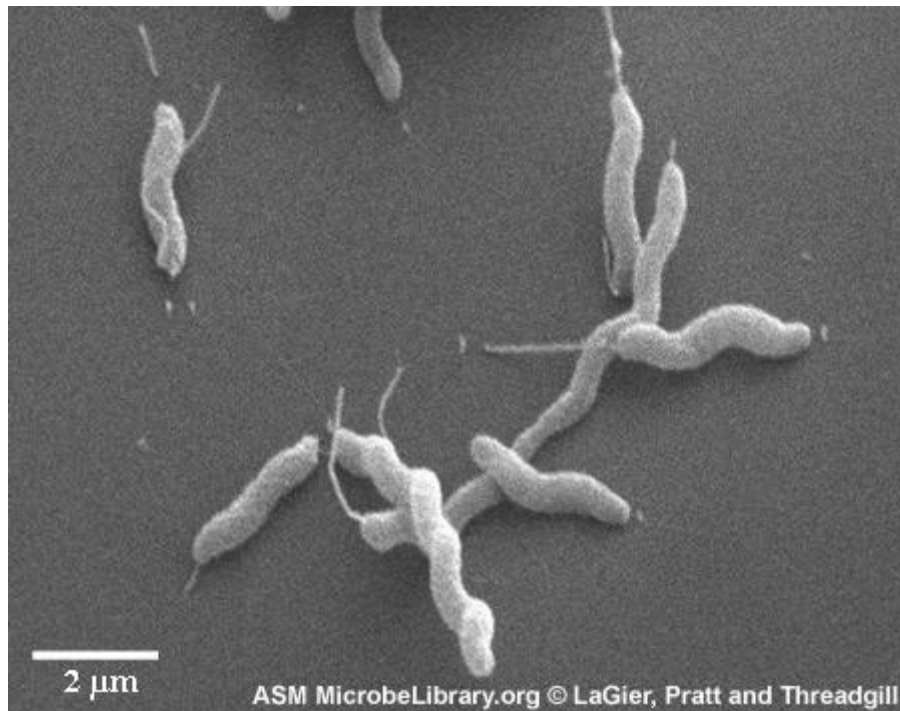
Kampylobakteerit ovat yleisin ihmiselle suolistoinfektioita aiheuttava bakteeri maailmanlaajuisesti. Taudin saamisen vaadittava infektioannos on pieni, alle 500 solua. Oireet alkavat tyypillisesti 2 - 5 päivän kuluttua tartunnasta. Yleisimpiä oireita ovat ripuli, vatsakipu ja pahoinvointi. Jälkitauteina voi esiintyä reaktiivista niveltulehdusta (noin 4 - 5 %:lla tartunnan saaneista) ja vakavimpana ääreishermostoa vaurioittavaa Guillain-Barrén-oireyhtymää. Kampylobakteerien aiheuttamat vatsataudit ovat yleisimpiä alle 5-vuotiailla lapsilla sekä nuorilla aikuisilla. (Hakkinen 2010: 9.)

### 3.1.1 Termofiiliset kampylobakteerit

Termofiilillä kampylobakteereilla tarkoitetaan kampylobakteerilajeja, joiden optimikasvulämpötila on korkea (n. 42 °C). Termofiiliset kampylobakteerit ovat merkittävimmät ihmiselle tautia aiheuttavista kampylobakteereista. Termofiilisiä kampylobakteereita ovat *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* sekä *C. upsaliensis*. (Christensen ym. 2001: 6) Ne eivät kasva alle 30 °C:ssa eivätkä ilman happipitoisuudessa, joten ne eivät lisäännä ruoan käsittelyn tai varastoinnin aikana. Ne eivät myöskään kestä korkeita lämpötiloja (yli 60 °C), joten ne tuhoutuvat kuumennuksen yhteydessä. (Park 2002: 2.)

### 3.1.2 *Campylobacter jejuni*

*Campylobacter jejuni* on kampylobakteereihin kuuluva mikroaerofiilinen termofiili laji, jolle on ominaista hoikka S-mainen muoto (Kuva 2.) ja korkkiruuvimainen liike. *C. jejuni* kasvaa parhaiten 42 °C:n lämpötilassa, kun ilman happipitoisuus on 5 % ja hiilidioksidipitoisuus 10 %, mutta se voi kuitenkin kasvaa 30 - 45 °C:n välillä, mikäli kaasukoostumus on oikea ja ravintoa on saatavilla (Reeser ym. 2007: 1). *C. jejuni* saavuttaa stationäärivaiheen noin kahden vuorokauden kasvun jälkeen, jonka jälkeen niiden määrä alkaa vähentyä. Elintarvikkeissa *C. jejuni* inaktivoituu huomattavasti nopeammin huoneenlämmössä kuin jääkaappilämpötilassa (4 °C). (Doyle 1989: 77.) *C. jejuni* on eläin- ja elintarvikenäytteistä eristetyistä kampylobakteerikannoista ainoa hippuraattiposiitivinen kanta, tosin myös hippuraattinegatiivisia *C. jejuni* -kantoja esiintyy (OIE 2008: 1189).



Kuva 2. *Campylobacter jejuni* -bakteereita pyyhkäisyelektronimikroskooppikuvassa. (Bioguest 2011)

*C. jejuni* on jaettu kahteen alalajiin: *C. jejuni jejuni* ja *C. jejuni doylei*. Alalaji *jejuni* on yleisemmin eristetty laji ja ihmiselle tyypillisesti vatsatautia aiheuttava laji. *C. jejuni doylei* on nirsompi ja hitaammin kasvava laji, joka ei pysty kasvamaan yli 43 °C:ssa. (Christensen ym. 2001: 6.)

*C. jejuni* sekä toisen merkittävän patogeenin, *C. coli*, merkitys ihmisten suolistotulehdusten aiheuttajina selvisi vasta 1970-luvulla, kun selektiivinen eristysmenetelmä kehittyi (Hakkinen 2010: 9). Arviolta 80 - 90 % kampylobakteeri-infektioista on *C. jejuni* aiheuttamia ja 5 - 10 % *C. coli* aiheuttamia (Perkiömäki ym. 2012: 83).

*C. jejuni* esiintyy usein nautojen suoliston mikrobifloorassa, mutta ne eivät aiheuta aikuisille eläimille sairautta (OIE 2008: 1185). Naudanlihassa kampylobakteereita ei Suomessa ole todettu, mutta sen sijaan raakamaidon nauttiminen on todettu riskitekijäksi *C. jejuni* tartunnoille, ja raakamaitoepidemioita on raportoitu Suomessa ja ulkomailla useita (Hakkinen M. 2014).

### 3.1.3 Muut kampylobakteerilajit

Tällä hetkellä *Campylobacter*-suvun bakteereita on eristetty ihmisestä 20 eri lajia ja eläimistä vieläkin enemmän. Uusia lajeja eristetään säännöllisesti. (Ban. 2001: 1). Taudinaiheuttajina merkittävimmät ovat *C. jejuni* sekä *C. coli*. Muita ihmiselle infektoita aiheuttavia kantoja ovat mm. *C. fetus*, *C. lari*, *C. upsaliensis* sekä *C. hyointestinalis*.

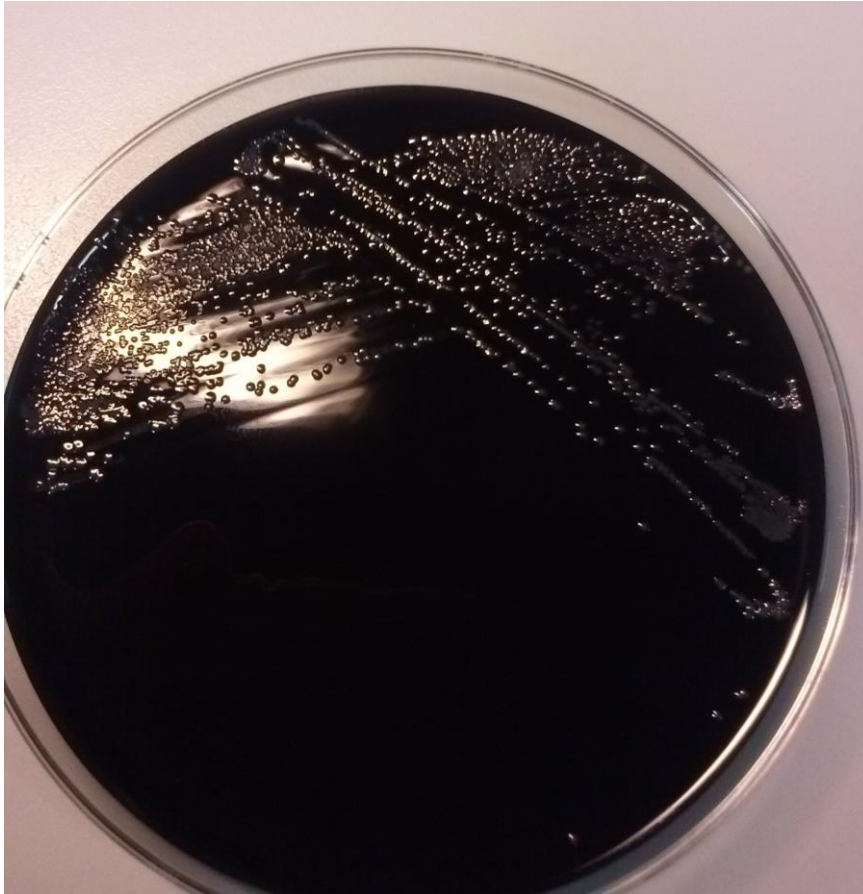
### 3.2 Mikroaerofiilisten kampylobakteerien kasvatusta ja tunnistus

Tässä työssä ei käydä läpi anaerobisten kampylobakteerien kasvatusta ja tutkimista, sillä opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia yksinomaan ihmiselle tärkeimpiä taudinaiheuttajalajeja, joista merkittävimmät ovat *C. jejuni*, *C. coli* ja *C. lari*.

Elintarviketutkimuksissa ISO-menetelmästandardin (ISO 10272-1:2006) ja NMKL 119:2007 -menetelmän mukaan termofiilisiä kampylobakteereita rikastetaan 48 tuntia 41,5 °C:ssa 5 % happi- ja 10 % hiilidioksidipitoisuudessa. Rikastusliemenä käytetään Bolto -lientä, joka sisältää kefoperatsonia ja hemolysoitua hevosen verta. Kampylobakteerit ovat kefoperatsonille resistenttejä, mutta useimmat muut bakteerit herkkiä.

Inkuboinnin jälkeen rikastuslientä siirrostetaan hajotusviljelynä selektiiviselle mCCD-hiilimaljalle, joka sisältää myös kefoperatsonia. Maljoja inkuboidaan 48 tuntia 41,5 °C:ssa 5 % happi- ja 10 % hiilidioksidipitoisuudessa.

Tyypillisten kampylobakteerien alustava tunnistus mCCD-agarilta tehdään silmämääräisesti sekä mikroskopoimalla. Kampylobakteeripesäkkeet näyttävät maljalla vaaleanharmailta, joskus metallinhohtoisilta, litteiltä pesäkkeiltä, ja ne voivat levitä kostealla agarpinnalla, peittäen koko maljan (Kuva 3). Kasvuvaiheessa olevat bakteerit ovat lyhyitä, S:n muotoisia, joille on tyypillistä korkkiruuvimainen, nopea liike. Vanhemmissa viljelmissä kampylobakteerit esiintyvät kokkoideina. Alustavan tunnistuksen jälkeen maljalta otetaan yksi tyypillinen pesäke jatkotutkimuksia varten esimerkiksi veriagarmaljalle, jota inkuboidaan 24 - 48 tuntia samoissa olosuhteissa kuin mCCD-agareitakin. (Evira 2012: 4)



Kuva 3. Kampylobakteeripesäkkeitä mCCD-agarmaljalla.

### 3.3 Biokemialliset testit

Termofiilisten kampylobakteerien lajitunnistus tehdään biokemiallisilla testeillä, jotka erottavat kampylobakteereista *C. jejuni*/*colin*/*larin* (Liite 1).

### 3.4 MALDI-TOF-MS -tekniologia bakteerin tunnistamisessa

Bakteereita voidaan tunnistaa ja luokitella massaspektrometriaan perustuvalla MALDI-TOF-MS (matriisiavusteinen laser desorptio/ionisaatio -lentoaika) -tekniologialla (Kuva 4). Kyseisen tekniologian etuna verrattuna perinteisiin biokemiallisiin testeihin on sen nopeus, sekä useilla bakteerilajeilla luotettava lajitunnistus. On myös viitteitä siitä, että MALDI-TOF on edullisempi vaihtoehto kuin biokemialliset testit. (CADTH 2011: 9.)



Kuva 4. Brukerin MALDI-TOF-laite.

Massaspektrometria perustuu molekyylien hajottamiseen ioneiksi esimerkiksi elektronisuihkun avulla ja näiden ionien massa-varaussuhteen laskemiseen. Massaspektrometriaa voidaan käyttää orgaanisten yhdisteiden tunnistamisessa ja yhdisteiden pitoisuuksien määrittämisessä. (Opetushallitus 2014.)

MALDI (Matrix Assisted Laser/Desorption Ionization ) -teknologia kehitettiin vuonna 1988 ja on siitä lähtien ollut yleisesti käytetty väline peptidien, proteiinien ja monien muiden biomolekyylien tunnistuksessa. MALDI-teknologia perustuu nimensä mukaisesti matriisiavusteiseen laserionisointiin. Matriisi on kiteytyvä, yleensä UV-valoa absorboiva heikko orgaaninen happo, joka sekoitetaan tutkittavaan näytteeseen. Matriisiliuos haihtuu ja jäljelle jää kiteytynyt matriisi, johon myös näyte on kiteytynyt.

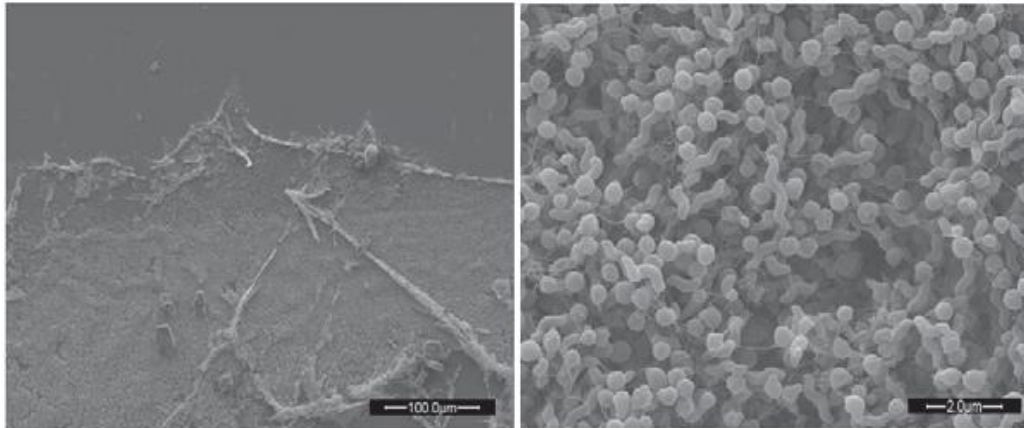
Matriisi-näytteseokseen kohdistetaan laser, jonka jälkeen seos höyrystyy. Matriisin tarkoitus on absorboida osa laservalon energiasta ja siten vähentää näytteeseen kohdistuvaa energiaa. Matriisi toimii myös protonien luovuttajana ja vastaanottajana, jolloin se ionisoi näytettä positiivisesti ja negatiivisesti. (Lewis ym. 2000: 1.)

TOF-MS (Time-of-Flight Mass Spectrometry) eli lentoaika-analysaattori on yksi MALDI-teknologiassa yleisesti käytetty massa-analysaattori. Siinä tutkittaviin ioneihin kohdistetaan kaikkiin sama määrä energiaa, jolloin ne lähtevät kiihtymään kohti detektoria. Ioneilla on sama energia, mutta eri massa, joten ne saavuttavat detektorin eri aikaan. Aika, joka ioneilla menee saavuttaakseen detektorin, on riippuvainen ionien massasta, varauksesta ja kineettisestä energiasta. (Lewis ym. 2000: 2.)

MALDI-TOF-laitteella voidaan tunnistaa bakteereja suku- tai lajitasolle asti. Tunnistus tapahtuu automaattisesti ajon jälkeen, kun laite vertaa tutkittavan kannan spektriä laitevalmistajan bakteerikirjaston spektreihin. Ohjelma nimeää tutkittavan kannan, antaa kommentteja tunnistuksen luotettavuudesta ja muista seikoista jotka ovat olennaisia tuloksen tulkinnassa.

### 3.5 Bakteerien biofilminmuodostus

Biofilmillä tarkoitetaan bakteerien muodostamaa, jäsentynyttä kerrostumaa inertillä tai elävällä pinnalla (Kuva 5). Kerrostuma rakentuu polymeereistä ja sen tarkoituksena on suojata bakteereita niille epäsuotuisilta vaikutuksilta, kuten antibiooteilta, happamalta ympäristöltä tai säteilyltä. (Proal 2008.) Biofilmissä olevat bakteerit voivat olla jopa 1000 kertaa vastustuskykyisempiä antibiootteja ja desinfiointiaineita vastaan, kuin vapaana olevat bakteerit. (Reuter ym. 2010: 2122).



Kuva 5. Pyyhkäisyelektronimikroskoopilla otettu kuva *C. jejuni* muodostamasta biofilmistä lasipinnalla 2500- ja 10 000-kertaisilla suurennuksilla. (Gunther & Chen 2008: 50)

Biofilmi muodostuu, kun niin kutsutut planktoniset eli yksittäiset bakteerit kiinnittyvät johonkin pintaan (esimerkiksi lasi, muovi, metalli tai kudokset) ja alkavat tuottaa limaa. Lima muokkaa pintaa siten, että muiden bakteerien on yhä helpompi kiinnittyä siihen. Näin ollen bakteerit kasaantuvat samaan paikkaan, jonka jälkeen ne alkavat muodostaa biofilmiä. Bakteerit voivat myös asuttaa jo valmiiksi luotuja biofilmejä. (Proal 2008.) Valmiin biofilmin muodostukseen voi kulua aikaa useista tunneista jopa useisiin viikkoihin, riippuen ympäristöstä. Lypsylaitteistoissa ja -välineissä biofilminmuodostus on usein hyvin nopeaa (8 - 12 tuntia). (Marchand ym. 2012: 135.)

Bakteereilla, jotka muodostavat biofilmiä, on todettu olevan kyky kommunikoida keskenään. Kommunikointi perustuu kemiallisiin viesteihin ja niiden tarkoitus on viestittää bakteereille, että niiden ympärillä on muita bakteereita, jolloin ne alkavat muodostaa biofilmiä. Kommunikoinnin avulla bakteerit myös tietävät milloin niiden on lähdettävä biofilmistä. (Proal 2008.)

Vasta viime vuosina on huomattu, että bakteerien muodostamilla biofilmeillä on suuri rooli erilaisissa infektioissa, autoimmuunisairauksissa ja kroonisissa sairauksissa. Biofilmien aiheuttamat oireet ovat usein ongelmallisia, sillä biofilmistä vapautuu bakteereita sykleittäin, joten passiivisessa vaiheessa oireet voivat olla lieviä tai kadota kokonaan ja aktiivisessa vaiheessa taas palata. Biofilmit voivat aiheuttaa tai olla osasyynä muun muassa kystisessä fibroosissa, hammasplakin muodostuksessa, sisäkorvan tulehduksessa, munuaiskiven muodostuksessa ja endokardiitissa. Lisäksi bakteerit voivat muodostaa biofilmiä esimerkiksi tamponeihin, piilolinssihin,



elintarvikkeisiin ja erilaisiin ihmisen sisälle asennettaviin laitteisiin, kuten tekoniveeliin tai sydänventtiileihin ja aiheuttaa niiden kautta erilaisia infektoita. (Proal 2008.)

Teollisuuden tuotantolinjoilla biofilmit aiheuttavat runsaasti ongelmia. Biofilmin muodostukseen vaikuttaa merkittävästi sen pinnan ominaisuudet, johon bakteerit ovat kosketuksissa. Yleistäen voidaan sanoa, että bakteerit kiinnittyvät paremmin hydrofiiliseen pintaan (esimerkiksi ruostumaton teräs ja lasi), kuin hydrofobiseen pintaan (esimerkiksi teflon ja kumi). (Chmielewski & Frank 2006: 23.) Biofilmin muodostus on runsaampaa korkeammassa lämpötilassa (37 °C verrattuna 22 °C:seen), jonka lisäksi myös virtaus tehostaa bakteerien kiinnittymistä (Marchand ym. 2012: 136).

Tuotantolinjan pintojen ominaisuuksien lisäksi merkittävässä roolissa biofilmin muodostukselle ovat laitteistoissa olevat kulmat, halkeamat, venttiilit, tiivisteet ja liitoskohdat. Kyseiset kohdat luovat bakteereille hyvän paikan muodostaa biofilmiä niiden epäsäännöllisen muodon vuoksi. Lisäksi ne ovat usein vaikeasti puhdistettavia niiden muodon tai sijainnin vuoksi, mikä edesauttaa biofilmiä muodostusta. Muodostunut biofilmi kiihdyttää materiaalien korroosiota ja kulumista. Meijereissä biofilmit ovat yksi merkittävimmistä toistuvan kontaminaation aiheuttajista. (Marchand ym. 2012: 136).

#### Kampylobakteerien kyky muodostaa biofilmiä

Kampylobakteereilla on todettu olevan kyky muodostaa biofilmiä erilaisille pinnoille, sekä asuttaa jo valmiita biofilmejä. Kampylobakteereiden biofilminmuodostus näyttäisikin olevan hyvin suuressa roolissa niiden selviytymisen kannalta sellaisissa olosuhteissa, jotka normaalisti olisivat niille kuolettavia (mm. lämpötila, happi). Hapellisissa oloissa tai vedessä olevat kampylobakteerit elävät jopa kaksi kertaa pidempään, mikäli ne ovat biofilmin sisällä. (Reuter ym. 2010: 2122.)

Reuter ym. (2010: 2122 - 2126) tutkivat kuinka hyvin *C. jejuni* muodostaa biofilmiä aerobisissa olosuhteissa, sekä kuinka paljon *C. jejuni* liikkuvuus vaikuttaa biofilmin muodostukseen. Tutkimuksessa selvisi – ehkä hieman yllättäen – että *C. jejuni* muodostaa enemmän biofilmiä lasipinnalle, kun se on happirikkaassa ympäristössä (20% O<sub>2</sub>). Lisäksi todettiin, että liikkuvuuden menetys vaikuttaa negatiivisesti

biofilminmuodostukseen *C.jejuni* kannalla. Tämä merkitsisi sitä, että kampylobakteerien biofilminmuodostuskyky näyttäisi vahvasti riippuvan niiden flagellojen toimivuudesta.

Toisessa, Guntherin & Chenin (2008: 44 - 50), tutkimuksessa tutkittiin mikroaerofiilisten ja anaerobisten kampylobakteerikantojen kykyä muodostaa biofilmiä erilaisilla alustoilla. Mikroaerofiilikantoja oli 10, joista kaksi kantaa oli *C.jejunia*. Anaerobikantoja oli kuusi kappaletta. Alustoina käytettiin lasia, ruostumatonta terästä ja muovia. Tutkimuksen mukaan mikroaerofiilisistä kannoista parhaiten biofilmiä tuotti *C. jejuni*. Toinen *C. jejuni* -kannoista tuotti biofilmiä lasille ja ruostumattomalle teräkselle, toinen vain ruostumattomalle teräkselle. Muista kahdeksasta mikroaerofiilikannasta ainoastaan neljä kantaa tuotti biofilmiä ruostumattomalle teräkselle, mutta ei muille pinnoille. Tutkimuksessa käytetyistä anaerobikannoista kaikki muodostivat biofilmiä kaikille pinnoille. Näyttäisi siis siltä, että anaerobiset kannat sekä tietyt *C.jejuni* -kannat tuottavat parhaiten biofilmiä. Tutkimuksessa todettiin, että biofilminmuodostus kahden saman bakteerikannan välillä voi olla hyvinkin vaihtelevaa. Tästä syystä ei voida yleistää, tuottaako jokin kanta biofilmiä vai ei, kunnes asiaa on tutkittu tarkemmin.

## Kokeellinen osio

Kokeellisessa osiossa seurattiin kampylobakteereiden esiintyvyyttä naudoissa kolmella eri maitotilalla, sekä niiden mahdollista kulkeutumista maitoon. Kaikilla seurattavilla tiloilla oli aikaisemmin esiintynyt kampylobakteereita, joten niitä oletettiin löytyvän. Lisäksi tutkittiin yhdellä maitotilalla esiintyneen *C. jejuni* -kannan kykyä muodostaa biofilmiä lasi- ja teräspinnalle aerobisissa ja mikroaerobisissa olosuhteissa. Työssä myös validoitiin *Campylobacter jejuni/coli/lari* -bakteerien tunnistus Eviralle hiljattain hankitulla MALDI-TOF-laitteistolla, siten että MALDI-TOF-menetelmä voisi jatkossa korvata tällä hetkellä käytössä olevat biokemialliset testit.

## 4 Materiaalit ja menetelmät

### 4.1 Maitotiloilta tutkittavat näytteet

Näytteitä otettiin kolmelta eri maitotilalta noin kolmen kuukauden ajan. Näytteet kuljetettiin Eviraan kylmälaukkuun pakattuna ja tutkittiin seuraavana päivänä

näytteenotosta . Näytteitä tuli säännöllisesti yhdeltä tilalta, jonka lisäksi toiselta tilalta tuli yksi näyte-erä ja kolmannelta tilalta kaksi näyte-erää. Tutkittavia näytteitä oli kokoomanäytteet naudan ulosteista, suodatin-, raakamaito- ja sivelynäytteet (ympäristönäyte). Lisäksi yhdeltä tilalta otettiin yksi kaivovesinäyte. Ulosteiden kokoomanäytteet (4 - 13 osanäytettä/näyte-erä) kerättiin tuoreena suoraan lehmän ulosteesta tai navetan lattialta. Raakamaitonäytteet otettiin tankkimaidosta viimeisen lypsyn jälkeen ennen tankin tyhjennystä ja ne tutkittiin viitenä rinnakkaisena näytteenä. Suodatinnäytteet otettiin maitonäytteen yhteydessä ajalta, jolloin sama maitoerä oli kertynyt tankkiin. Sivelynäytteet otettiin nautojen juomavesialtaista. Alla olevassa taulukossa (Taulukko 4) on esitetty kunkin näytteen lukumäärä kaikilta tiloilta.

Taulukko 4. Maitotiloilta otetut näytteet ja niiden määrät.

Tila	Näytemäärä				
	Uloste	Maito	Suodatin	Sively	Vesi
1	28	11*	34	33	3**
2	6	1*	2	6	0
3	24	2*	7	22	0
Yhteensä	58	14*	43	61	3

\* = Näytteistä tehty 5 rinnakkaista rikastusta

\*\* = Näytteistä tehty 2 rinnakkaista rikastusta

#### 4.2 Näytteiden käsittely ja tutkiminen

Näytteiden saapuessa ne kirjattiin Eviralla käytössä olleeseen ELMO-laboratoriotiedonhallintajärjestelmään ja jokaiselle näytteelle annettiin niin sanottu HMIK-numero, joka toimi näytteen tunnisteena ja näyttenumerona jatkossa.

Kaikkia näytteitä käsiteltiin aseptisesti kampylobakteeri/EHEC -laboratoriossa. Näytteet tutkittiin Evira 3409 -menetelmällä, joka on muunnos NMKL119(2007) ja ISO 10272-1:2006 -menetelmistä. Ulostenäytettä punnittiin 10 g, jonka jälkeen se rikastettiin 90 ml:ssa Bolton-lientä mikraerobisesti 41,5 °C:ssa 24±2 h. Maitonäytettä mitattiin 25 ml viiteen eri pulloon (=5 rinnakkaisnäytettä) ja näytteet rikastettiin 225 ml:ssa Bolton-lientä samoissa olosuhteissa kuin ulostenäytteet. Suodatinnäyte leikattiin pituussunnassa kahtia, joista toinen osa meni EHEC-tutkimusta varten. Suodatinnäyte rikastettiin samalla tavalla kuin maitonäyte. Sivelynäyte, joka oli otettu

näytteenottosienellä, puolitettiin (toinen puolikas EHEC-tutkimukseen) ja kasvatettiin 90 ml:ssa Bolton-lientä samoissa olosuhteissa kuin muut näytteet. Vesinäyte suodatettiin 0,45 µm:n suodatinkalvon läpi. Kalvo puolitettiin (toinen EHEC-tutkimusta varten) ja puolikkaasta kalvosta tehtiin 2 rinnakkaisnäytettä, jotka rikastettiin 225 ml:ssa Bolton-lientä 37 °C:ssa 24±2 h.

Rikastuksen jälkeen näytteistä siirrostettiin 10 µl mCCD-agarille. Maljoja inkuboitettiin mik aeroobisesti 41,5 °C:ssa 48±2 h.

mCCD-maljoilta poimittiin veriagarmaljoille biokemiallisia tunnistuksia varten 5 tyypillistä pesäkettä (ulosteista 3 pesäkettä). Tyypillisten pesäkkeiden alustava tunnistus tehtiin silmämääräisesti sekä mikroskopoimalla. Puhdasviljelmiä kasvatettiin mik aeroobisesti 41,5 °C:ssa 48±4 h.

Biokemialliset testit tehtiin Eviran ohjeen 3409 mukaan. Jos tutkittava kanta oli resistentti nalidiksiinihapolle, eikä se hydrolysoinut hippuraattia, niin tehtiin lisäksi indoksyylisasetaattitesti. Biokemiallisilla testeillä pystyttiin tunnistamaan lajikohtaisesti kampylobakteereista *C. jejuni/coli/lari*. Muita kampylobakteerilajeja testi ei erotellut, jolloin tulos oli *Campylobacter sp.* Biokemiallisilla testeillä todetut kampylobakteerit ajettiin MALDI-TOF-laitteella validointia varten (ajoihin vain 1 rinnakkainen näyte), jonka jälkeen näytteet pakastettiin (-70 °C). Lopuksi tulokset kirjattiin ELMOon.

#### 4.3 MALDI-TOF-laitteiston validointi

##### 4.3.1 Validoinnin tarkoitus

Validoinnin tarkoituksena oli korvata Evirassa *C. jejuni*-, *C. coli*- sekä *C. lari* -bakteerien tunnistamisessa käytetyt biokemialliset varmistustestit (menetelmäohje Evira 3409/4). MALDI-TOF-menetelmällä oli mahdollista lyhentää tunnistukseen kuluva aikaa referenssimenetelmään verrattuna jopa 2–4 vuorokaudesta noin 15 minuuttiin. Validointiaineisto ja tulokset esitettiin FINASille (Suomen kansallinen akkreditointielin), jotta MALDI-TOF-menetelmä saatiin Eviran akkreditoituun pätevyysalueeseen käytettäväksi kampylobakteerien tunnistuksessa. Menetelmä hyväksyttiin akkreditoinnin piiriin 10.6.2014.

## Menetelmän periaate

Mikrobien tunnistaminen MALDI-TOF:lla perustuu mikrobeille tyypillisiin massaspektreihin. Suurimmalle osalle mikrobeista, kuten kampylobakteereille, sopii suora siirrostus, jolloin solumassaa levitetään näytespotille ja päälle lisätään matriisiliuosta (1  $\mu$ l) (Kuva 6). Neste matriisista haihtuu muutamassa minuutissa, jonka jälkeen näytelevy siirretään MALDI-TOF-laitteeseen. Ajon alettua solumassaa ammutaan laserilla, jolloin vapautuu ionisoituneita molekyylejä. Tiedetyt mikrobit, kuten itiölliset bakteerit, saattavat vaatia uuttokäsittelyitä, jotta ionisoituneita molekyylejä irtoaisi laserilla. Molekyylihuhteiden, varausten ja lentoaikojen perusteella syntyy spektri. Laite vertaa saatua massaspektriä tietokantaan ja ilmoittaa vastaavuudet sekä tuloksen luotettavuutta kuvaavan tunnuslukuarvon. Menetelmä tunnistaa kantoja joko suku- tai lajitasolle. Kampylobakteerit MALDI-TOF tunnistaa lajitasolle.



Kuva 6. MALDI-TOF:ssa käytettävä näytelevy. Nestepisarat ovat matriisiliuosta, joka ei vielä ole ehtinyt haihtua.

#### 4.3.2 Käytetyt bakteerikannat

Validoinnissa käytettiin ATCC:ltä hankittuja *Campylobacter* -kantoja, EU-referenssilaboratorion vertailunäytetutkimuksista saatuja kantoja, sekä Evirassa menetelmäohjeen 3409/4 mukaisesti tunnistettuja *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* ja *C. spp* -kantoja. Muut kannat olivat kampylobakteerin kaltaisia kantoja, mutta ei kuitenkaan kampylobakteerikantoja. Muita kantoja käytettiin, jotta saatiin selville tunnistaako MALDI-TOF ne virheellisesti kampylobakteereiksi. Validoinnissa käytetyt kannat on esitetty alla olevassa taulukossa (Taulukko 5).

Taulukko 5. Validoinnissa käyteyt kannat ja niiden lukumäärät.

Kanta	Kpl
<i>C. jejuni</i>	70
<i>C. coli</i>	26
<i>C. lari</i>	6
<i>Campylobacter spp.</i>	17
Muut	6

Validoinnissa kolme näytettä hylättiin, jolloin niitä ei ole otettu huomioon tuloksissa (eikä taulukossa 5). Näistä kolmesta näytteestä yksi epätyypillinen näyte tunnistui *C. hyointestinalis* -lajiksi (maljalla ollut todennäköisesti sekakasvua), yksi *C. insulaenigrae* tunnistui *C. lari* -lajiksi (hyvin alhaisilla tunnuslukuarvoilla, <1,8) ja yksi *C. coli* tunnistui *C. upsaliensis* -lajiksi (hyvin alhaisilla tunnuslukuarvoilla, <1,85). Yhteensä tutkittavia kantoja oli 125 kappaletta (128 kpl, jos hylätyt näytteet huomioitu), jonka lisäksi suoritettiin 41 uusinta-ajoa sellaisille näytteille, jotka saivat tunnuslukuarvon alle 2,3 (kaikkia alle 2,3:n ajoja ei kuitenkaan ole uusittu).

Validoinnissa käytetyt kannat otettiin syväjästä (-70 °C) ja viljeltiin verimaljalla 41,5 °C:ssa mikroaerobisesti. Kannat tutkittiin 24 h, 48 h ja 72 h inkuboinnin jälkeen, jotta saatiin selville inkubointiajan vaikutus tunnuslukuun. Jokaisesta näytteestä tehtiin kaksi rinnakkaista spottia, jolloin saatiin pienennettyä käsialasta johtuvaa vaihtelua.

#### 4.4 Biofilmikokeet

##### 4.4.1 Kokeiden tarkoitus

Biofilmikokeilla haluttiin selvittää erään aiemman raakamaitoepidemian aiheuttaneen *C. jejuni* -kannan (kanta 909) kykyä tuottaa biofilmiä erilaisissa olosuhteissa. Kyseessä oleva kanta aiheutti pitkäkestoisen raakamaidon kontaminaation tilalla. Koska Eviralla oli epäily, että kontaminaatio on peräisin lypsylaitteistosta tai maitotankista, niin haluttiin selvittää kannan kyky muodostaa biofilmiä. Kontrollikantana käytettiin toista *C.jejuni* -kanta (kanta 720), jonka on raportoitu tuottavan biofilmiä (Gunther IV & Chen 2008: 45.)

Biofilmikokeita ehdittiin tehdä neljä kappaletta ja niitä oli tarkoitus jatkaa minun lopetettua. Ensimmäisessä kokeessa tutkittiin biofilmin tuoton tutkimusmenetelmää eli sitä, kuinka hyvin meidän koejärjestelmä tuottaa biofilmiä. Kokeessa kontrollikantaa kasvatettiin sekä mikroaerobisesti että aerobisesti.

Toisessa kokeessa vertailtiin kahdeksan samalta tilalta eristetyn *C. jejuni* -kannan kykyä tuottaa biofilmiä objektilasille (mukana epidemian aiheuttanut kanta 909 sekä kontrollikanta 720). Kannoille tehtiin myös kaksi erillistä liikkuvuustestiä.

Kolmannessa kokeessa tutkittiin, kuinka hyvin kanta 909 tuottaa biofilmiä objektilasille aerobisissa olosuhteissa verrattuna mikroaerobisiin olosuhteisiin.

Neljännessä kokeessa tutkittiin kannan 909 kykyä tuottaa biofilmiä rosterilevyille (0-kontrolleina objektilasit) mikroaerobisissa olosuhteissa.

Biofilmikokeita varten ei ollut valmiita työohjeita, vaan työt pohjautuivat pääosin aikaisemmin tehtyihin julkaisuihin biofilmeistä (artikkelit: ”*The biofilm forming potential of bacterial species in the genus Campylobacter*”, julkaisijat Gunther IV. yms.; ”*Biofilm Formation by Campylobacter jejuni Is Increased under Aerobic Conditions*”, julkaisijat Reuter M. yms; ”*Identification of Motility and Autoagglutination Campylobacter jejuni Mutants by Random Transposon Mutagenesis*”, julkaisijat Golden N.J. yms.). Kyseisissä julkaisuissa todettiin, että *C. jejuni* -kannan kyky tuottaa biofilmiä paranee aerobisissa olosuhteissa, jonka lisäksi *C. jejuni* tuottaa paremmin biofilmiä rosterilevyille kuin objektilasille.

#### 4.4.2 Kokeiden toteutus

Kaikissa biofilmikokeissa peruseriaate oli sama. Aluksi kannat tuoreutettiin ottamalla ne syväjäästä ja inkuboimalla niitä verimaljalla  $48 \pm 4$  h  $37^\circ\text{C}$ :ssa mikroaerobisesti. Verimaljalta poimittiin 1  $\mu\text{l}$ :n silmukalla yksi pesäke ja se siirrostettiin 10 ml:aan Brucella-lientä. Liemen annettiin inkuboitua  $24 \pm 2$  h  $37^\circ\text{C}$ :ssa mikroaerobisesti. Liemestä siirrostettiin 10  $\mu\text{l}$ :n silmukallinen Falcon-putkiin, joissa oli 30 ml Brucella-lientä. Falcon -putkiin laitettiin joko steriloidut objektilasit (kokeet 1, 2, 3 ja 4) tai rosterilevyt (koe 4). Putkien päälle laitettiin liekkikuumennettu folio (kokeessa 2 käytettiin korkkeja), jonka jälkeen putket laitettiin inkuboitumaan  $37^\circ\text{C}$ :seen aerobisesti (kokeet 1 ja 3) tai mikroaerobisesti (kokeet 1, 2, 3 ja 4) niin pitkäksi aikaa, että biofilmiä oli havaittavissa silmämääräisesti. Alla olevassa taulukossa (Taulukko 6) on esitetty kaikista kokeista kantojen, rinnakkaisien näytteiden ja yhteisnäytteiden lukumäärät sekä inkubointiajat.

Taulukko 6. Biofilmikokeiden koejärjestely.

Biofilmikoe #	Kantojen lukumäärä	Rinnakkaisnäytteitä	Näytteitä yhteensä	Inkubointiajat/vrk
1.	1	4	20	2 ja 6
2.	8	3	52	6 ja 7
3.	2	5	44	4 ja 6
4.	2	5	44	5 ja 6

Jokaista rinnakkaisnäytettä tehtiin neljä kappaletta (poislukien koe 2, jossa tehtiin kaksi kappaletta) siten, että kummallekin inkubointiajalle oli omat näytteet ja lisäksi aerobi/mikroaerobi- tai objektilasi/rosterilevykasvuille omat näytteet. Kaikissa kokeissa tehtiin lisäksi neljä nollakontrollia. Selvennyksen vuoksi kokeen 3 näytteiden lukumäärät on esitetty esimerkkinä alla (Taulukko 7).

Taulukko 7. Biofilmikoe 3:n koejärjestely.

Kanta	96-tunnin kasvu		148-tunnin kasvu	
	Aerobi	Mikroerobi	Aerobi	Mikroaerobi
909	5	5	5	5
720 (kontrolli)	5	5	5	5
Nollakontrolli	1	1	1	1

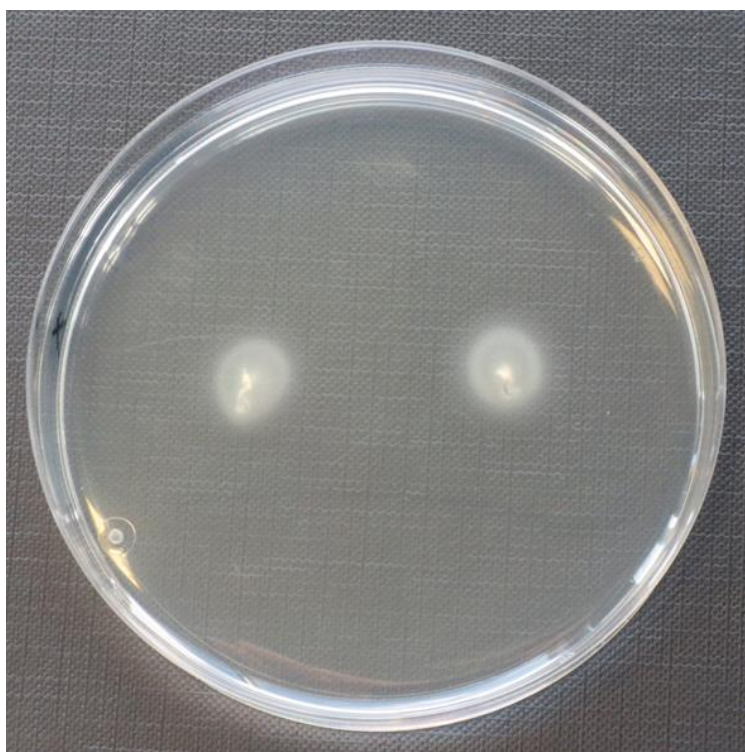
Sopivan inkubointiajan jälkeen objektilasit/rosterilevyt poistettiin Falcon-putkista steriileillä pinseteillä ja asetettiin alkoholilla kostutetun imupaperin päälle. Neljästä rinnakkaisesta putkesta tehtiin aerobinen viljely, jotta saatiin mahdolliset kontaminaatiot



selville. Yhdestä rinnakkaisesta putkesta tehtiin laimennussarja (-9, -8 ja -7 laimennukset) bakteerimäärän selvittämiseksi. Viljelyt tehtiin verimaljoille, ja niitä inkuboitin 48 h 37 °C:ssa mikroaerobisesti (kokeessa 3 ja 4 osa puhtasviljelmistä inkuboitin aerobisesti).

Objektilasit/rosterilevyt tutkittiin silmämääräisesti ja stereomikroskoopilla. Näytteet, joissa todettiin biofilmiä, värjättiin ja tutkittiin valomikroskoopilla. Lopuksi osa edustavimmista näytteistä valokuvattiin stereo- ja valomikroskoopilla.

Biofilmikokeiden lisäksi tehtiin kaksi liikkuvuustestiä kokeen 2 näytteille. Testit suoritettiin siirrostamalla aikaisemmin kasvatetusta 10 ml:n Brucella-liemestä 1 µl bakteerimassaa pistoviljelynä puolijähmeälle Mueller Hinton –agarmaljalle (Kuva 7). Ensimmäisessä kokeessa tutkittiin yhtä kantaa/malja ja toisessa kokeessa maljalla oli sekä kontrollikanta että tutkittava kanta. Liikkuvuutta tutkittiin 18 h, 24 h ja 42 h inkubointien jälkeen mittaamalla bakteerin muodostaman kehän halkaisija.



Kuva 7. Esimerkkikuva liikkuvuustestistä Mueller Hinton –agarmaljalla, oikealla positiivinen kontrollikanta ja vasemmalla epidemian aiheuttanut kanta.

## 5 Tulokset

### 5.1 Kampylobakteerien esiintyminen maitotiloilla

Kaikilta kolmelta tutkittavalta maitotilalta eristettiin kampylobakteereita (Taulukko 8).

Taulukko 8. Näytteistä todetut kampylobakteerit prosenttiyksikköinä kaikilta kolmelta maitotilalta, suluissa tutkittujen näytteiden lukumäärä.

Näyte	Tila 1	Tila 2	Tila 3	Yhteensä
Uloste	36 % (28)	83 % (6)	67 % (24)	57 % (58)
Sively	0% (33)	17 % (6)	0% (22)	2 % (61)
Maito	0% (11)	0% (1)	0% (2)	0% (14)
Suodatin	0% (34)	0% (2)	0% (7)	0% (43)
Vesi	0% (3)	-	-	0% (3)

Suurimmasta osasta ulostenäytteitä todettiin kampylobakteereita. Sivelynäytteistä/ympäristönäytteistä vain yksi oli kampylobakteeriposiitivinen, Maito-, suodatin- ja vesinäytteistä ei löydetty kampylobakteereita.

Tilalta 1 eristettiin prosentuaalisesti vähiten kampylobakteereita. Tilalta 2 eristettiin prosentuaalisesti eniten kampylobakteereita, jonka lisäksi se oli ainoa tila, josta eristettiin myös nautojen juomavesialtaasta otetusta sivelynäytteestä kampylobakteeria. Tilalta 3 eristettiin määrällisesti eniten kampylobakteereita (16 kappaletta).

Tilalta 1 eristetyistä näytteistä tunnistettiin 10 eristettyä kantaa, joista 6 oli *C. jejuni* -kantaa ja 4 *C. hyointestinalis* -kantaa (MALDI-TOF:n antama tulos, biokemiallinen antoi tulokseksi *C. spp*). Tilalta 2 eristetyt kannat olivat kaikki *C. jejuni* -kantoja (6 kpl). Tilalta 3 eristetyistä 16 kannasta 11 oli *C. jejunia* ja 5 *C. spp:tä* (joista 3 tunnistettiin MALDI-TOF:lla *C. hyointestinalis* -lajiksi).

Taulukossa 9 on eritelty vielä ensimmäisen maitotilan näytteenottokerroilta saadut tulokset, sillä kyseiseltä tilalta tuli useita näyte-eriä. Lukuarvot tarkoittavat eristettyjen kampylobakteerien määrää. Katkoviiva näytteen kohdalla tarkoittaa, että siinä näyte-erässä ei kyseistä näytettä tullut.

Taulukko 9. Tilan 1 näytteenottokerrat ja niiden tulokset.

Näyte-erä #	Uloste	Sively	Maito	Suodatin	Vesi
1	3 *	0	0	0	0
2	-	-	0	-	-
3	-	-	0	-	-
4	-	-	0	-	-
5	4 **	0	0	0	0
6	-	-	0	-	-
7	-	-	0	-	-
8	-	-	0	-	-
9	3 ***	0	0	0	0
10	-	-	0	-	-
11	-	-	0	-	-

\* = kaikki *C. jejuni* -kantaa

\*\* = kolme *C. jejuni* -kantaa ja yksi *C. hyointestinalis*

\*\*\*= kaikki *C. hyointestinalis* -kantaa

Uloste-, sively-, suodatin- ja vesinäytteitä otettiin kolmella näytteenottokerralla. Jokaisesta ulostenäyte-erästä eristettiin kampylobakteereita, mikä viittaisi pysyvään kampylobakteeritartuntaan eläimillä. Näyttäisi siltä, että *C. hyointestinalis* syrjäytti *C. jejuni* -kannan myöhemmissä näyte-erissä, sillä ensimmäisessä näyte-erässä oli ainoastaan *C. jejuni*, toisessa näyte-erässä molempia ja viimeisessä ainoastaan *C. hyointestinalis* -kantaa. Näin pienestä otoksesta ja lyhyestä seurantajaksosta on tosin mahdotonta tehdä varmoja johtopäätöksiä. Maitonäytteitä tuli jokaisessa näyte-erässä, joista kaikki olivat puhtaita. Sively-, suodatin- ja vesinäytteet olivat myös kaikilla (3 kappaletta) näytteenottokerroilla puhtaita.

## 5.2 Validoinnin tulokset

Validoinnissa käytettiin Eviran työohjeen LAB 7085/1 mukaista MALDI-TOF-menetelmää. Tunnistus hyväksyttiin heti, mikäli tunnistuksessa saatu tunnusluku oli  $\geq 2,3$ . Menetelmässä oli määritelty eri tunnusluvuille tulkintaohjeet:

2,300 – 3,000	Hyvin todennäköinen lajin tunnistus
2,000 – 2,299	Varma suvun tunnistus, todennäköinen lajin tunnistus
1,700 – 1,999	Todennäköinen suvun tunnistus
0,000 – 1,699	Ei luotettava tunnistus

Validointia varten päätettiin, että mikäli tunnuslukuarvo jää alle 2,3, mutta on kuitenkin välillä 2,2 - 2,3, niin siinä tapauksessa tarkasteltiin lähemmin MALDI-TOF-ohjelman

antamaa taulukkoa, joka antaa kyseiselle näytteelle 10 lähintä bakteerivaihtoehtoa. Mikäli taulukossa olevat kannat olivat samaa lajia (tai taulukossa ei ollut saman suvun muita lajeja), niin silloin tulos hyväksyttiin luotettavaksi.

### 5.2.1 Inkubointiaikojen vertailu

Validointia varten vertailtiin 24 h, 48 h ja 72 h inkubointiaikojen vaikutusta MALDI-TOFin antamiin tunnuslukuarvoihin. Alla olevassa taulukossa (Taulukko 10) on otettu huomioon ainoastaan sellaiset ajot, joista on 72 h inkuboinnit tehty. Prosenttiosuudet tarkoittavat tunnuslukuarvon 2,3 ylittävien ajojen osuutta (esim. *C. jejuni* -kannoista 24 h inkuboinnin jälkeen 77,8 % sai 2,3 tai sitä suuremman tunnuslukuarvon). Otoskoot ovat hyvin pieniä, sillä 72 h inkubointiajan todettiin jo aikaisessa vaiheessa antavan hyvin alhaisia tunnuslukuarvoja, joten niitä ei myöhemmissä ajoissa enää tehty. Taulukosta on jätetty pois Muut -kannat, sillä niitä oli ajettu 72 h inkuboinnilla ainoastaan yksi kappale. Taulukossa ei ole otettu huomioon uusinta-ajoja.

Taulukko 10. Tunnuslukuarvon 2,3 ylittävien ajojen vertailu kolmella eri inkubointiajalla, suluisissa näytemäärät.

Kanta	Kasvatusaika		
	24 h	48 h	72 h
<i>C. Jejuni</i> (9)	78 %	22 %	0 %
<i>C. Coli</i> (4)	100 %	100 %	50 %
<i>C. Lari</i> (2)	50 %	100 %	100 %
<i>C. spp.</i> (6)	67 %	50 %	33 %

Menetelmä antoi 72 h inkuboinnin jälkeen huomattavasti alhaisempia tunnuslukuarvoja kuin 24 h ja 48 h ajoissa. *C. jejuni* -kannoista ei 72 h jälkeen yksikään näyte ylittänyt tunnuslukuarvoa 2,3, ja *C. coli* -kannoista enää puolet ylitti kyseisen arvon. *C. lari* antoi 72 h jälkeen edelleen luotettavan tuloksen. *C. spp.*t saivat huonompia tuloksia 72 h jälkeen, jonka lisäksi yksi kannoista tunnistui 72 h jälkeen vääräksi (*C. upsaliensis* tunnistui *C. helveticus* -kannaksi).

Seuraavaksi vertailtiin 24 h ja 48 h inkubointiaikojen antamia tunnuslukuarvoja (Taulukko 11). Prosenttiosuus kertoo tunnuslukuarvon 2,3 ylittävien ajojen osuuden. *Campylobacter* spp:ssä ja Muut -osioissa ei ollut kolmessa näytteessä kasvua 24 h

jälkeen, jolloin niitä ei ole huomioitu otoksessa. Viidestä *C. coli* -kannasta MALDI-TOF ei saanut tulosta (no peaks found), jolloin tämä tulos on tulkittu siten, että tunnuslukuarvo on alle 2,3. Taulukossa 11 ei ole otettu huomioon uusinta-ajoja.

Taulukko 11. Tunnuslukuarvon 2,3 ylittävien ajojen vertailu inkubointiajoilla 24 h ja 48 h, suluissa näytemäärät.

Kanta	Kasvatusaika	
	24 h	48 h
<i>C. jejuni</i> (32)	78 %	38 %
<i>C. coli</i> (24)	71 %	50 %
<i>C. lari</i> (4)	75 %	100 %
<i>C. spp.</i> (14/16)	43 %	31 %
Muut kannat (1/2)	100 %	100 %

*C. jejuni* -kannoilla tunnuslukuarvon 2,3 ylittävien osuus oli 48 h inkuboinnin jälkeen noin puolet siitä, mitä se oli 24 h inkuboinnin jälkeen. *C. coli* n tulos huononi 48 h inkuboinnin jälkeen noin kolmanneksen verrattuna 24 h inkubointiaikaan. *C. jejuni* -kannoista alle 2,3 antavista tuloksista (kantojen lukumäärä 20 ) 85 % sai tuloksen, joka oli 2,2 ja 2,3 välillä ja *C. coli* n 66,7 % (otoskoko 12, joista kahdessa ei tulosta (no peaks found)). *C. lari* antoi paremman tuloksen 48 h inkuboinnin jälkeen. *C. spp.* n tulos huononi hieman 48 h inkuboinnin jälkeen. Muiden kantojen tulos pysyi ennallaan.

### 5.2.2 Tunnuslukuarvojen tarkastelu

Inkubointiaikojen vertailun lisäksi laskettiin, kuinka monta prosenttia tunnistuksista (tulos voi olla joko 24 h tai 48 h ajoista) sai arvoksi  $\geq 2,3$  ja kuinka moni sai arvon välillä 2,2 - 2,3 (Taulukko 12). Taulukossa 12 on otettu huomioon uusinta-ajot.

Taulukko 12. Kahden eri tunnuslukuarvon ylittävien ajojen prosenttiosuudet 24 h tai 48 h inkuboinneilla, suluissa näytemäärät.

Kanta	Tulos ( $\geq 2,3$ )	Tulos (2,2 - 2,3)
<i>C. jejuni</i>	96 % (70)	67 % (3)
<i>C. coli</i>	96 % (26)	100 % (1)
<i>C. lari</i>	100 % (6)	-
<i>C. spp.</i>	47 % (17)	22 % (9)
Muut kannat	83 % (6)	0 % (1)

*C. jejuni* ja *C. coli* saivat lähes kaikki yli 2,3 arvon ja *C. lari* -kannoista kaikki ylittivät kyseisen arvon. *C. jejuni* -kannoista ainoastaan 3 kpl sai arvoksi alle 2,3. Näistä kolmesta kaksi sai arvon, joka oli välillä 2,2 - 2,3. Arvon 2,2 alittava kanta sai arvoksi 2,184. *C. coli* -kannoista ainoastaan yksi sai arvoksi alle 2,3, arvon ollessa kuitenkin välillä 2,2 - 2,3. *C. spp.* -kannat tunnistuivat huomattavasti huonommin. Muut kannat pääsivät melko hyvin arvon 2,3 yli (5/6).

### 5.2.3 Sensitiivisyys ja spesifisyys

Sensitiivisyys (herkkyys) kuvaa, kuinka usein menetelmä tunnistaa oikeat (*C. jejuni/coli/lari* -kannat) oikeiksi. Spesifisyys (tarkkuus) ilmaisee, kuinka hyvin menetelmä tunnistaa väärät (*C. spp* ja Muut kannat) vääriksi. Spesifisyydessä ei ollut merkitystä sillä, että menetelmä tunnisti esimerkiksi *C. spp:n* ei-kampylobakteeriksi, vaan olennaista oli, ettei menetelmä tunnistanut *C.spp:tä* tai muita kantoja *C. jejuni/coli/lariksi*. Tunnistustulos hyväksyttiin luotettavaksi, jos tunnuslukuarvo oli yli 2,2. Sensitiivisyydessä on laskettu *C. jejuni/coli/larit* yhteen ja spesifisyydessä *C. spp:t* ja Muut. Tulokset laskettuna alla olevassa taulukossa (Taulukko 13).

Taulukko 13. Sensitiivisyys ja spesifisyys prosenttiyksikköinä tutkituista näytteistä, suluisissa näytemäärät.

	Tulos
Sensitiivisyys	99,0 % (102)
Spesifisyys	100 % (23)

Sensitiivisyys jäi alle 100%, sillä yksi näyte (*C. jejuni*) tunnistui alle 2,2 arvolla. Kaikki muut näytteet tunnistuivat oikein ja yli 2,2 arvolla. Spesifisyys oli 100%, sillä yksikään *C. spp:stä* tai muista kannoista ei tunnistunut *C. jejuni/coli/lariksi* (tunnuslukuarvolla 2,2).

### 5.3 Biofilmikokeiden tulokset

Biofilmikokeissa saadut tulokset eivät ole tarkkoja lukuarvoja, vaan tulkinnanvaraisia, silmämääräisesti ja mikroskoipoimalla tehtyjä havaintoja. Tietyissä mittauksissa on saatu selviä lukuarvoja (laimennussarjat ja puhtauskontrollit), mutta niiden tuloksia ei käydä tässä läpi, vaan ne on esitetty liitteenä (Liite 2). Taulukossa 14 on kerrottuna

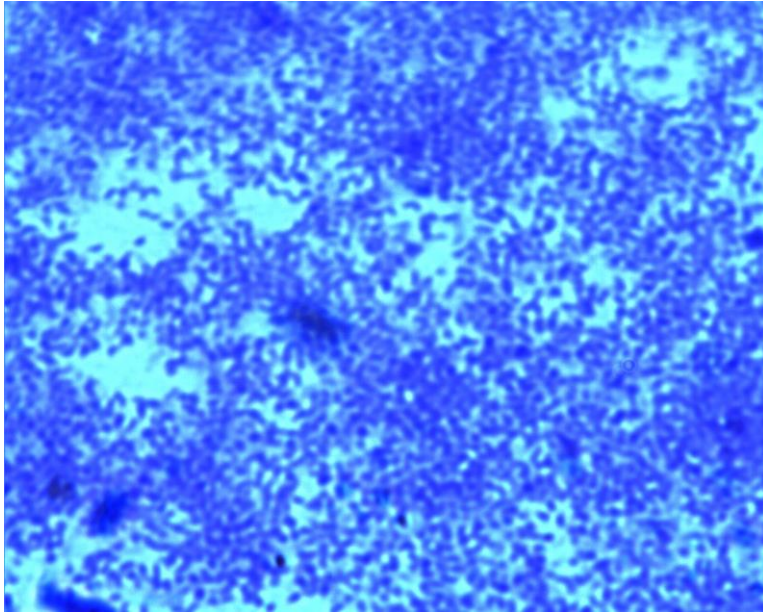
hyvin tiivistettynä kokeiden tarkoitus ja tulokset. Taulukon 14 jälkeen kerrotaan tarkemmin kokeiden sisällöstä.

Taulukko 14. Yhteenveto biofilmikokeista.

	Koe #			
	1.	2.	3.	4.
Kokeen tarkoitus	Tutkimusmenetelmän testaus	Kahdeksan <i>C. jejuni</i> -kannan biofilminmuodostuksen vertailu ja liikkuvuustestit	Raakamaitoepidemian aiheuttaneen kannan (909) kyky muodostaa biofilmiä aerobisissa olosuhteissa	Raakamaitoepidemian aiheuttaneen kannan kyky muodostaa biofilmiä rosterilevyllä
Tulokset	Kanta muodosti biofilmiä sekä mikroaerobisesti (2 ja 6 päivän jälkeen) että aerobisesti (6 päivän jälkeen)	Vain muutama kanta tuotti biofilmiä (ei tutkittava- tai kontrollikanta)	Kanta 909 muodosti 6 vrk:n inkuboinnin jälkeen jonkin verran biofilmiä. Kontrollikanta (720) ei ollenkaan.	Kanta 909 ja 720 muodostivat hyvin heikosti biofilmiä rosterilevyllä.

### 5.3.1 Biofilmikokeen toimivuuden testaus

Ensimmäisessä kokeessa saatiin varmistus sille, että koejärjestelyllä voidaan todeta biofilmin muodostuminen. Kontrollikanta (kanta 720) tuotti biofilmiä aerobisesti ja mikroaerobisesti. Puhtauskontrollit olivat puhtaita ja laimennussarjoissa todettiin kasvua  $10^{-8}$  ja  $10^{-7}$  -laimennuksissa. Kanta tuotti mikroaerobisesti biofilmiä jo 48 h inkuboinnin jälkeen ja aerobisesti 144 h kasvun jälkeen. Kuvassa 8 on kannan tuottamaa biofilmiä 144 h aerobikasvun jälkeen.



Kuva 8. Kontrollikannan tuottamaa biofilmiä valomikroskoopilla kuvattuna.

Kuvassa 8 on havaittavissa selviä kampakobakteerisiintymiä, joiden voidaan olettaa olevan biofilmiä. Kuvassa 9 on sama näyte kuvattuna stereomikroskoopilla.



Kuva 9. Kontrollikannan tuottamaa biofilmiä objektilasilla stereomikroskoopilla kuvattuna.

Kuvassa 9 näkyy selvä biofilmivyöhyke, jonka ympärillä on ohuempaa kasvustoa.



### 5.3.2 Kahdeksan eri kannan vertailu

Toisessa kokeessa vertailtiin kahdeksan nautojen ulosteesta tai raakamaidosta eristetyn kannan biofilminmuodostusta. Yksi kanta tuotti biofilmiä 120 h inkuboinnin jälkeen. Kaksi muuta kantaa tuottivat biofilmiä 144 h inkuboinnin jälkeen (toisessa kasvua kahdessa rinnakkaisessa näytteessä, toisessa vain yhdessä). Kannat 909 (epidemian muodostanut/tutkittava kanta) ja 720 (kontrollikanta) eivät tuottaneet ollenkaan biofilmiä. Puhtauskontrollit olivat kaikissa näytteissä puhtaita (inkubointi mikroaerobisesti). Laimennussarjojen perusteella kaikissa näytteissä oli noin  $10^8$  solua.

Liikkuvuustesteissä kontrollikanta, epidemiakanta ja yksi lypsyrätistä eristetty kanta tuottivat lähes yhtä suuret halot (kannat olivat siis liikkuvuudeltaan samaa luokaa) kaikilla inkubointiajoilla. Muut kannat (viisi ulosteesta eristettyä kantaa) tuottivat noin puolet pienemmät halot.

### 5.3.3 Aerobi- ja mikroaerobikasvun vertailu

Taulukossa 15 on esitetty kolmannen kokeen tulokset molemmilla inkubointiajoilla. Aerobikasvua on havaittavissa 144 h inkuboinnin jälkeen kahdessa rinnakkaisessa näytteessä (kanta 909).

Taulukko 15. Kolmannen biofilmikokeen tulokset. Kokeessa vertailtiin biofilminmuodostusta aerobisissa ja mikroaerobisissa olosuhteissa.

Näyte	96-tunnin inkubointi		144-tunnin inkubointi	
	Aerobi	Mikroerobi	Aerobi	Mikroaerobi
909/1*	-	-	+++	+
909/2*	-	-	-	++
909/3*	-	-	-	+
909/4*	-	-	+++	-
909/5*	-	-	-	-
720/1	-	-	-	++
720/2	-	-	-	-
720/3	-	+++	-	++
720/4	-	-	-	+
720/5	-	-	-	-

\* = näytteet kontaminoituneet

- = ei biofilmiä

+ = ohut biofilmi

++ = silminnähtävä, ei erityisen paksu biofilmi

+++ = selvä, paksu biofilmi

Kannan 909 viljelmät olivat kaikki kontaminoituneet. Kannan 720 ja nollakontrollin viljelmät olivat kaikki puhtaita. Aerobikasvujen puhtauskontrollit inkuboituiin aerobisesti ja mikroaerobikasvujen puhtauskontrollit mikroaerobisesti. Laimennussarjoissa oli noin  $10^8$  solua 96 h inkuboinnin jälkeen ja noin  $10^7$  solua 144 h inkuboinnin jälkeen. Pesäkkeet olivat useissa maljoissa levinneet.

#### 5.3.4 Raakamaitoepidemiaan liittyneen kannan kyky muodostaa biofilmiä rosterilevyille

Kokeessa tutkittiin, kuinka hyvin kanta 920 tuottaa biofilmiä rosterilevyille. Rosterilevyt olivat saman muotoisia ja kokoisia kuin objektilasit. Taulukossa 16 on esitetty kokeen tuloksia molemmilla inkubointiajoilla. Rosterilevyillä havaittiin ohutta biofilmiä kolmessa eri näytteessä.

Taulukko 16. Neljännen biofilmikokeen tulokset. Kokeessa vertailtiin biofilminmuodostusta rosteri- ja lasilevylle mikroaerobisissa olosuhteissa.

Näyte	120-tunnin inkubointi		144-tunnin inkubointi	
	Rosteri	Lasi	Rosteri	Lasi
909/1	-	+	-	+
909/2	+	+	-	-
909/3	-	-	-	-
909/4	-	-	-	-
909/5	-	-	-	+
720/1	+	+++	-	+++
720/2	-	+++	+	+
720/3	-	+++	_*	-
720/4	-	+++	_*	+++
720/5	-	+++	_*	+++

\* = näytteet kontaminoituneet

- = ei biofilmiä

+ = ohut biofilmi

+++ = selvä, paksu biofilmi

Kannan 909 puhtauskontrollit olivat kaikki puhtaita (muutamissa maljoissa yksittäisiä pesäkkeitä). 144-tunnin inkuboinneissa viljelmät 720/3, 4 ja 5 olivat kontaminoituneita. Nollakontrollit olivat puhtaita. Puhtauskontrollit inkuboitiin 120 tunnin inkuboinneissa aerobisesti ja 144 tunnin inkuboinneissa mikroaerobisesti. Laimennusarjoissa molemmissa inkubointiajoissa oli noin  $10^8$  solua, joista tosin monissa maljoissa bakteerit olivat levinneet.

## 6 Tulosten tarkastelu

### 6.1 Maitotilojen näytteet

Ulostenäytteistä oletettiin löytyvän runsaasti kampylobakteereita, sillä kampylobakteerit kuuluvat usein nautojen suolistomikrobiflooraan. Kaikilta tiloilta nautojen ulosteista löydettiinkin kampylobakteeria, joten tulosten perusteella voidaan alustavasti todeta, että kaikilla kolmella tilalla maidon kontaminaatoriski on olemassa. Tilalta 2 löydettiin lisäksi yhdestä nautojen juomavesialtaasta otetusta sivelynäytteestä kampylobakteeria, joten maidon kontaminaatoriski kyseisellä tilalla lienee korkeampi. Maito- ja suodatinnäytteet eivät olleet kontaminoituneet, joten uloste ei ilmeisesti ole ollut

kosketuksissa suodatinlaitteistojen ja sitä kautta maidon kanssa. Näyttäisi siis siltä, että lypsäminen on hoidettu hygieenisesti.

Näytteitä saatiin kuitenkin suhteellisen vähän ja lyhyen aikaa, joten varmojan johtopäätöksiä maitotilojen kunnosta ei voi tehdä. Maitotilojen seuranta jatkuu Evirassa vuoden 2016 kevääseen saakka, mutta tähän työhön ei rajallisen ajan vuoksi sisällytetä kuin reilun kahden kuukauden aikana tulleet näytteet.

## 6.2 MALDI-TOF-menetelmän validointi

Validointiajot onnistuivat hyvin, ja tunnuslukuarvot olivat pääosin yli 2,3:n. Tunnusluvun arvoon vaikutti muun muassa tekijän käsiala (bakteerimassan määrä spotilla) sekä bakteerikasvuston ikä (pääsääntöisesti mitä nuorempi bakteerikasvusto, sitä korkeampi tunnusluku). Validointiin saatiin myös edustava otos tutkittavia kantoja, joten tuloksia voidaan pitää melko luotettavina. Sensitiivisyys (99,0 %) ja spesifisyys (100%) saivat myös hyvät arvot.

Inkubointiajoista selvästi paras oli 24 h inkubointi, joka antoi suurimmalle osalle kannoista parempia tuloksia. *C. lari* tosin sai parempia tuloksia 48 h inkuboinnin jälkeen. Tämä johtui todennäköisesti siitä, että *C. lari* on hitaammin kasvava kanta kuin *C.jejuni/coli*. Vaikka MALDI-TOF antoi 48 h inkuboituneille näytteille selvästi huonompia arvoja kuin 24 h inkuboituneille näytteille, niin voidaan 48 h inkubointiaikaa kuitenkin pitää luotettavana, sillä tulokset olivat pääosin välillä 2,2 - 2,3, ja tarkempi tarkastelu (10 lähintä bakteeria -taulukko) osoitti, että tulokset ovat luotettavia. 72 h inkubointiaika antoi pääosin hyvin huonoja arvoja, jonka lisäksi yksi kanta tunnistui vääräksi. Tästä syystä voidaan todeta, että kampylobakteerien tunnistamisessa tulee käyttää ainoastaan 48 h tai sitä tuoreempia viljelmiä. Hidaskasvuiset kannat eivät välttämättä (esim. *C. lari*) tuota vielä ollenkaan kasvustoa 24 h inkuboinnin jälkeen, jolloin inkubointia on jatkettava kauemmin.

Korkeiden tunnuslukuarvojen sekä tarkan sensitiivisyyden ja spesifisyyden johdosta arvioisin, että MALDI-TOF-menetelmä soveltuu hyvin korvaamaan käytössä olevat biokemialliset testit. Menetelmä hyväksyttiinkin akkreditoinnin piiriin 10.6.2014, joten validointi on onnistunut halutulla tavalla.

MALDI-TOF-menetelmää ei tämän validoinnin perusteella voida kampylobakteerien osalta käyttää luotettavasti kuin ainoastaan *C. jejuni/colin/larin* tunnistamisessa. Muiden kampylobakteerilajien tunnistamista varten olisi suoritettava toinen validointi laajemmalla aineistolla. Alustavasti näyttäisi kuitenkin siltä, että MALDI-TOF-menetelmä tunnistaa tiettyjä kampylobakteerikantoja (esim. *C. hyointestinalis*) huonosti (alhaisilla tunnuslukuarvoilla tai väärin). Tämä saattaisi johtua esimerkiksi eri kantojen erilaisesta soluseinärakenteesta tai vähäisestä pesäkkeiden tuotosta maljalle.

### 6.3 Biofilmikokeet

Tehdyt biofilmikokeet olivat vasta esikokeita, joten varmoja johtopäätöksiä biofilminmuodostuksesta tutkittujen *C. jejuni* -kantojen suhteen on tässä vaiheessa mahdotonta tehdä. Kokeiden perusteella ainakin osa tutkituista *C. jejuni* -kannoista näyttäisi tuottavan biofilmiä lasilevylle mikroaerobisesti (koe 2).

Tutkittava raakamaitoepidemiaan liittynyt kanta 909 näyttäisi tuottavan biofilmiä lasilevylle ainakin mikroaerobisesti ja mahdollisesti myös aerobisesti (koe 3). Aerobikasvusta ei voida olla varmoja, sillä kaikki näytteet olivat kontaminoituneet, jolloin aerobikasvussa tuotettu biofilmi saattoi olla jonkun muun bakteerin tuottamaa. Kontaminoituminen on todennäköisesti tapahtunut jo siirrostusvaiheessa Falcon-putkiin, jolloin luonnollisesti kaikki biofilmiputket ovat kontaminoituneet. Kontrollikanta tuotti ensimmäisessä kokeessa biofilmiä aerobisesti (tosin heikommin kuin mikroaerobisesti), mutta kolmannessa kokeessa biofilmiä ei syntynyt aerobisesti ollenkaan. Kokeet tehtiin samalla tavalla, joten syynä ei ole ainakaan koejärjestelyn muutos. Ensimmäisessä kokeessa biofilmiä muodostui vasta 144 tunnin jälkeen ja silloinkin melko vähän, joten erilainen tulos voi selittyä normaalilla vaihtelulla kokeissa.

Tutkittava kanta sekä kontrollikanta tuottivat hyvin heikosti biofilmiä teräslevylle. Oletuksena oli, Guntherin & Chenin (2008: 44 - 50) tutkimuksen perusteella, että *C. jejuni* tuottaisi teräslevylle paremmin biofilmiä kuin lasilevylle. Kokeita teräslevylle ehdittiin tehdä vain yksi kappale, joten ei voida sanoa tuottavatko kyseiset kannat biofilmiä teräslevylle, ennen kuin lisäkokeita on suoritettu.

Biofilmikokeiden toteutus ja etenkin tulosten tulkinta oli melko hankalaa, sillä sama bakteerikanta saattoi käyttäytyä eri tavalla eri koekerralla, jolloin saatu tulos vaihteli

huomattavastikin. Kokeiden toteutuksessa tapahtuvat pienetkin muutokset saattoivat osaltaan vaikuttaa merkittävästi biofilmin syntyyn (esimerkiksi käytettiinkö biofilmiputkissa korkkeja vai foliota ja oliko lasilevyt pesty vai ei). Kontaminoituminen aiheutti myös jonkin verran ongelmia kokeissa.

Tutkittava kanta on aiheuttanut yhdellä maitotilalla epidemian, jonka lisäksi se on ollut syynä pitkäaikaisessa maidon kontaminaatiossa. Kannan biofilminmuodostuskyky voisi viitata siihen, että kyseinen kanta on päässyt muodostamaan biofilmiä maitolaitteistoon, jolloin bakteeria ei ole pystytty tuhoamaan tilalla tehdyillä lukuisilla pesu- ja desinfiointitoimenpiteillä.

## 7 Yhteenveto

Työn tarkoituksena oli selvittää kampylobakteereiden esiintymistä kolmella eri lypsykarjatilalla noin kolmen kuukauden ajan. Kaikilta maitotiloilta oli aiemmin eristetty kampylobakteereita. Näytteinä olivat uloste-, raakamaito-, suodatin-, ja sivelynäytteet (ympäristönäyte). Lisäksi yhdeltä tilalta otettiin yksi näyte nautojen juomavedestä (kaivovesinäyte). Tämän lisäksi työssä tutkittiin aiemmin raakamaidon välityksellä epidemian ja maidon jatkuvan kontaminoitumisen aiheuttaneen *Campylobacter jejuni* -kannan kykyä tuottaa biofilmiä lasi- ja teräspinnalle, sekä validoitiin MALDI-TOF-menetelmä korvaamaan kampylobakteerien lajitunnistuksessa käytetyt biokemialliset testit.

Kaikilta kolmelta maitotilalta eristettiin ulostenäytteistä kampylobakteereita. Yhdeltä tilalta eristettiin myös yhdestä nautojen juomavesialtaasta otetusta sivelynäytteestä kampylobakteeria. Maito-, suodatin- ja vesinäytteet olivat kaikilla tiloilla puhtaita. Biofilmikokeissa tutkittava kanta tuotti biofilmiä lasilevyille mikraerobisesti. Teräslevylle kanta tuotti hyvin heikosti biofilmiä. MALDI-TOF-laitteiston validointi onnistui hyvin ja menetelmä hyväksyttiin akkreditoinnin piiriin 10.6.2014.

Kolmen kuukauden seurantajakson perusteella näyttäisi siltä, että kampylobakteereita esiintyy kaikkien kolmen maitotilan nautakarjan suolistossa. Tulos oli odotettu, sillä nautojen suolistoflooraan kuuluu usein kampylobakteerit. Maito- ja suodatinnäytteet olivat kaikki puhtaita, joten kampylobakteerien leviäminen ulosteista maitoon sekä laitteistoihin on saatu estettyä, jonka lisäksi lypsyhygienia on ollut hyvä.

Sivelynäytteestä löydetty kampylobakteeri viittaisi siihen, että ulostetta ja sitä kautta kampylobakteeria on levinnyt navettaympäristöön.

Maitotilojen seuranta jatkuu Evirassa aina 2016 kevääseen saakka, jonka lisäksi biofilmikokeita on myös tarkoitus jatkaa. Tässä opinnäytetyössä lyhyen (kolme kuukautta) seurantajakson perusteella on kuitenkin mahdotonta tehdä varmoja johtopäätöksiä maitotilojen kunnosta. Biofilmikokeita *C.jejuni* -kannalle tehtiin ensimmäistä kertaa Evirassa, joten myös niiden tulokset ovat ainoastaan alustavia ja suuntaa antavia.

## Lähteet

Ban, Mishu Allos. 2001. *Campylobacter jejuni* Infections: Update on Emerging Issues and Trends. Departments of Preventive Medicine and Medicine, Division of Infectious Diseases, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee. s. 1

Bioguest. 2008. Verkkodokumentti. <<http://bioquest.org/peer2011/wp-content/uploads/2011/08/Campylobacter-jejuni-SEM.jpg>> Luettu 6.3.2014

CADTH. 2011. MALDI-TOF Mass Spectrometry for Bacterial Species Identification: A Review of Diagnostic Accuracy and Clinical and Cost-Effectiveness. Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health. s. 9

Chmielewski R.A.N, Frank J.F. 2006. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. s. 23

Christensen B, Sommer H, Rosenquist H, Nielsen N. 2001. Risk assessment on *Campylobacter jejuni* in chicken products. The Danish Veterinary And Food Administration. s. 6

Chynoweth RW, Hudson JA, Thom K. 1998. Aerobic growth and survival of *Campylobacter jejuni* in food and stream water. US National Library of Medicine National Institutes of Health. s. 1

Doyle, Michael P. 1989. Foodborne Bacterial Pathogens. USA, New York. s. 74 - 77

Elgersma A, Tamminga S, Ellen G. 2006. Modifying milk composition through forage. Animal feed science and technology. s. 1

Evira 2012. *Campylobacter jejuni/coli/lari* –bakteerien osoittaminen ja tunnistaminen. Menetelmäohje. s. 4

Evira 2013. Tietoa elintarvikkeista: ruokamyrkytykset. Verkkodokumentti. <[www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/tietoa+elintarvikkeista/elintarvikevaarat/ruokamyrkytykset/](http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/tietoa+elintarvikkeista/elintarvikevaarat/ruokamyrkytykset/)> Luettu 13.2.2014



Gunther IV, NW & Chen, CY. 2008. The biofilm forming potential of bacterial species in the genus *Campylobacter*. Food Microbiology 26 (2009), s. 44 - 50

Hakkinen, Marjaana. 2010. Finnish cattle as reservoir of *Campylobacter* spp. Väitöskirja. Helsingin yliopisto, eläinlääketieteellinen tiedekunta. s.1 - 9

Hakkinen, Marjaana. 2014. Tohtori, Elintarvikemikrobiologiajaosto, Evira, Helsinki. Viesti. 12.6.2014

Jaakkonen, A., Nummela, M., Granbäck, S., Ruoho, O., & Hakkinen, M. 2013. Persisting *Campylobacter* jejuni contamination of raw milk on a dairy farm. Evira. s. 1

Lawley, Richard. 2013. Food Safety Watch: *Campylobacter*. Verkkodokumentti. <<http://www.foodsafetywatch.org/factsheets/campylobacter/>>. Luettu 20.2.2014

Lehtinen, Riitta. 2012. Ruokamyrkytykset ja elintarvikeinfektioibakteerit. Opetuskalvo. Metropolia ammattikorkeakoulu. Vantaa.

Lindström, Miia & Hakkinen, Marjaana. 2014. Hankesuunnitelma. Evira. Helsinki.

MMM. 2013. Asetus raakamaidon tuotannon ja luovutuksen elintarvikehygieniasta. Maa- ja metsätalousministeriö. Helsinki.

Maitohygienialiitto 2012. Laatuhinnoitteluluokitus. Verkkodokumentti. <<http://www.maitohygienialiitto.fi/tilastot/laatuhinnoitteluluokitus/36-maidon-jakaantuminen-luokkiin>> Luettu 12.2.2014.

Maitohygienialiitto. 2014. Mikrobilääkejäämät maidossa. Verkkodokumentti. <<http://www.maitohygienialiitto.fi/tilastot/mikrobilaeaekejaemaet-maidossa>> Luettu 14.5.2014.

Marchand S., De Block J., De Jonghe V., Coorevits A., Heyndrickx M., Herman L. 2012. Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. s.135 - 136

Meriluoto, Milla. 2009. Lypsytekniikan ja vuodenajan vaikutus raakamaidon mikrobiologiseen laatuun. Insinööritoimisto. Metropolia ammattikorkeakoulu, bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma.

OIE. 2008. *Campylobacter jejuni* and *campylobacter coli*. OIE Terrestrial Manual 2008, s. 1185 - 1189

Opetushallitus. 2014. Laboratorioanalyysit: Massaspektrometria. Verkkodokumentti. <[http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat\\_5-5\\_massaspektrometria.html](http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_5-5_massaspektrometria.html)>. Luettu 25.2.2014.

Park, Simon F. 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. International Journal of Food Microbiology. s. 2 - 3

Perkiömäki, Jonna; Leimi, Anna & Tuominen, Pirkko. 2012. Suomessa tuotetun raakamaidon biologiset vaarat –riskiprofiili. Evira. s. 15 - 83

Pietilä, Saara. 2011. Raakamaito: koostumus, käsittely meijerissä ja terveysvaikutukset. Kandidaatintutkielma. Helsingin yliopisto, Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta

Proal, Amy. 2008. Bacteriality. Understanding biofilms. Verkkodokumentti. <<http://bacteriality.com/2008/05/26/biofilm/>>. Luettu 4.3.2014

Reuter, M., Mallet A., Pearson B.M., van Vliet A.H.M. 2010. Biofilm Formation by *Campylobacter jejuni* Is Increased under Aerobic Conditions. Applied And Environmental Microbiology. American Society for Microbiology. s. 2122 - 2126

Reeser, Ryan J.; Medler, Robert T.; Billington Stephen J.; Jost Helen B. & Joens, Lynn A. 2007. Characterization of *Campylobacter jejuni* Biofilms under Defined Growth Conditions. Applied and Environmental Microbiology. American Society for Microbiology. s. 1

Said H.M.; Ong D.E. & Shingleton J.L. 1989. Intestinal uptake of retinol: enhancement by bovine milk beta-lactoglobulin. The American Society for Clinical Nutrition, Inc

THL. 2013. Raakamaitoa epäillään kampylobakteeriepidemian lähteeksi. <<https://blogi.thl.fi/web/infektiouutiset/etusivu/-/blogs/raakamaitoa-epaillaan-kampylobakteeriepidemian-lahteeksi-pohjanmaalla>>. Verkkodokumentti. Luettu 30.9.2014

THL. 2014. Raakamaito varmistui suolistotulehduksen aiheuttajaksi. <[http://www4.thl.fi/fi\\_FI/web/fi/uutinen?id=35808](http://www4.thl.fi/fi_FI/web/fi/uutinen?id=35808)>. Verkkodokumentti. Luettu 30.9.2014

Tike, MMM. Alueittainen maidontuotanto. <<http://www.maataloustilastot.fi/alueittainen-maidontuotanto>>. Verkkodokumentti. Luettu 12.2.2014

Zoonosikeskus. 2014a. Bakteerien aiheuttamat taudit: kampylobakteerit. <[http://www.zoonosikeskus.fi/portal/fi/zoonoosit/bakteerien\\_aiheuttamat\\_taudit/kampylobakteeri/](http://www.zoonosikeskus.fi/portal/fi/zoonoosit/bakteerien_aiheuttamat_taudit/kampylobakteeri/)> Verkkodokumentti. Luettu 19.2.2014

Zoonosikeskus. 2014b. Kampylobakteeri. Elintarvikevälitteiset epidemiat. <[http://www.zoonosikeskus.fi/portal/fi/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytysten\\_aiheuttajat/kampylobakteeri/](http://www.zoonosikeskus.fi/portal/fi/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytysten_aiheuttajat/kampylobakteeri/)>. Verkkodokumentti. Luettu 30.9.2014

## Biokemiallisen tunnistuksen ohje

*C. jejuni*, *C. coli* ja *C. lari* voidaan erottaa toisistaan hippuraatti-, nalidiksiinihappo- ja indoksyyliasetaattikokeilla:

Laji	Hippuraatin hydrolyysi	Nalidiksiinihappoherkkyys	Indoksyyliasetaatin hydrolyysi
<i>C. jejuni</i>	+	S (tai R)*	+
<i>C. coli</i>	-	S (tai R)*	+
<i>C. lari</i>	-	R	-

S = herkkä

R = resistentti

\* Nalidiksiinihapolle resistenttejä kantoja ei yleensä esiinny kotimaisissa näytteissä. Jos tutkittava kanta on resistentti eikä hydrolysoi hippuraattia, tehdään lisäksi indoksyyliasetaattikoe.

### Hippuraattiin hydrolyysikoe

Sekoita silmukalla runsaasti bakteerimassaa 0,4 ml:aan natriumhippuraattiliuosta, niin että liuos tulee selvästi sameaksi. Käytä positiivisena ja negatiivisena kontrollina *C. jejuni* EELA 446 - ja *C. coli* EELA 502 -bakteerikantoja. Inkuboi  $37 \pm 1$  °C vesihauteessa 2 h tai lämpökaapissa 4 h. Liuosta ei tarvitse inkuboida mik aeroobisesti.

Lisää varovasti 1 – 2 tippaa ninhydiiniliuosta. Älä sekoita. **Lue tulos 2-3 min kuluttua** ja aina viimeistään 10 minuutin sisällä.

Positiiviseksi reaktioksi luetaan syvä tummansininen väri. **Vaaleansininen väri luetaan negatiiviseksi.** Jos tulos on negatiivinen, koe toistetaan

*C. jejuni* antaa positiivisen tuloksen ja *C. coli* negatiivisen.

### Nalidiksiinihappoherkkyyskoe

Tee 0,1 % peptonisuolaveteen bakteerisuspensio, jonka sameus on McFarland 2. Viljele sitä 0,1 ml pintalevityksenä (toimintaohje LAB 702) veriagarille tai jollekin muulle ei-selektiiviselle agaralustalle, jolla kampylobakteerit kasvavat. Jos verimaljat ovat tuoreita, kuivaa niitä laminaarikaapissa 20 – 30 min. Käytä positiivisena kontrollina *C. jejuni* EELA 446 –bakteerikantaa.

Aseta agarin pinnalle nalidiksiinihappokiekko ja inkuboi maljaa kansi ylöspäin mikroaerobisesti  $37 \pm 1$  °C / 20 - 24 h tai tilanteen vaatiessa pidempään.

Kanta on herkkä (S), jos kiekon ympärillä on estovyöhyke, ja resistentti (R), jos bakteerikasvu on kiinni kiekossa.

### **Indoksyyliasetaatin hydrolyysi**

Tee indoksyyliasetaatin hydrolyysikoe niille kannoille, jotka ovat resistenttejä nalidiksiinihapolle eivätkä hydrolysoi hippuraattia.

### Biofilmikokeiden laimennussarjojen tulokset

28.2.2014	Näyte	Laimennus			Tulos
		$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	pmy/ml
	12121	10	3	1	1,26E+08
	12122	20	4	2	2,34E+08
	12127	30	5	0	3,15E+08
	12135	40	9	1	4,50E+08
	1945	30	4	0	3,06E+08
	909	40	3	0	3,87E+08
	511	10	1	0	9,91E+07
	E720	60	2	2	5,77E+08

13.3.	Näyte	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	pmy/ml	
	909 ma	10	1	4	1,35E+08	Pesäkkeet levinneet
	909 a	25	2	0	2,43E+08	
	720 ma	NA	6	1	6,31E+08	Pesäkkeet levinneet
	720 a	40	8	0	4,32E+08	

15.3.	Näyte	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	pmy/ml	
	909 ma	5	0	0	4,50E+07	
	909 a	5	1	0	5,41E+07	
	720 ma	1	0	0	9,01E+07	Levinnyt koko maljalle
	720 a	0	0	0	0,00E+00	

4.4.2014	Näyte	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	pmy/ml	
	909 rosteri	0	9	30	3,51E+08	
	909 lasi	1	1	14	1,44E+08	
	720 rosteri	9	1	0	9,01E+07	
	720 lasi	22	4	2	2,52E+08	

3.4.2014	Näyte	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	pmy/ml	
	909 rosteri	20	4	0	2,16E+08	$10^{-8}$ malja levinnyt
	909 lasi	10	2	0	1,08E+08	$10^{-7}$ malja levinnyt
	720 rosteri	Täynnä	Täynnä	0	-	
	720 lasi	10	0	0	9,01E+07	$10^{-7}$ malja levinnyt

ma = mikroaerobi

a= aerobi